



Departamento de Medicina  
Universidad de Santiago de Compostela

TESIS DOCTORAL

## **Bases Moleculares de las Lipodistrofias Familiares**

**Berta Victoria Martínez**

Santiago de Compostela, 2012





## **DIRECTOR:**

### **Dr. David Araujo Vilar**

Profesor Titular de Medicina.

Unidade de Enfermedades Tiroideas e Metabólicas (UETeM).

Departamento de Medicina. CIMUS-Facultade de Medicina e Odontoloxía. Universidade de Santiago de Compostela.

## **FINANCIACIÓN:**

- Xunta de Galicia PGIDIT03PXIB20801PR (DA-V)
- Xunta de Galicia PGIDIT04PXIC20801PN (JL-A)
- Xunta de Galicia UPGIDIT06PXIB208360PR (JL-A)
- Xunta de Galicia, Conselleria de Sanidade (PS09/17)
- Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS PI081449 (DA-V)
- Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS PI030401 (JL-A)
- Ministerio de Educación SAF2006-02542 (JLA)
- Fundación Mutua Madrileña
- Fundación Europea de Desarrollo Regional, FEDER
- European Project Euro-Laminopathies FP6-018690 (GL)
- Diputación Provincial de La Coruña, bolsa de investigación 2007 y 2008
- Sociedad Española de Lipodistrofias





**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**  
**FACULTADE DE MEDICINA E ODONTOLOXÍA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

D. David Araujo Vilar, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela,

HACE CONSTAR

Que el presente trabajo titulado “**Bases Moleculares de las Lipodistrofias Familiares**”, realizado bajo mi dirección por **Dña. Berta Victoria Martínez** en este Departamento, se encuentra concluido para ser presentado y así optar al grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela.

Firma el presente informe en Santiago de Compostela, a ... de ..... de 2012.

Fdo. David Araujo Vilar



*A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos si le faltara una gota.*

*M. Teresa de Calcuta*

*A mis padres*



## **Agradecimientos**

*En primer lugar, quiero agradecer al Prof. David Araújo Vilar por la oportunidad que me ha dado de realizar esta tesis doctoral, no sólo por la titulación a la que se aspira con su culminación, sino, y sobre todo, por la posibilidad de aportar nuevos conocimientos a la Biomedicina, de poner mi trabajo al servicio de la sociedad. Gracias por los conocimientos clínicos que me ha transmitido, por todo el tiempo dedicado y el esmero con el que me ha asesorado para garantizar la correcta realización de este trabajo.*

*Formar parte de la UETeM como grupo, como equipo, ha sido una experiencia muy enriquecedora, personal y profesionalmente. Agradezco al Prof. Joaquín Lado Abeal por su valioso apoyo y colaboración; a los compañeros y amigos por todo lo que me han aportado durante la realización de este trabajo, por todo lo que hemos compartido: Noelia, Fernando, Oscar, Pedro, Isa, Amparo, Ramón, Diego y demás miembros del grupo.*

*Agradezco la ayuda de los profesionales de la UETeM y otros grupos, departamentos e instituciones, que han colaborado directamente en la realización de este trabajo:*

*- De la UETeM, a Fernando Palos Paz, Oscar Pérez Guerra, Noelia Sánchez Martínez, Ana T. Costa Freitas, Alia Ramazanov, Sofía Sánchez Iglesias, Adrián Mosquera y Alberto Pañeda Menéndez, por su participación en parte de los estudios de laboratorio. A Blanca González Méndez, por su participación en el análisis de secuencias, interpretación de resultados, búsqueda de información y aporte de ideas.*

*- Del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, En el Servicio de Endocrinología e Nutrición, al grupo de investigación del Prof. Felipe Casanueva, en particular a la Dra. Ana Castro, Mary Lage y Marcos Pazos por la realización de los estudios de composición corporal mediante DEXA, y al Dr José Manuel Cabezas Agrícola por la selección de algunos pacientes.*

*En el Servicio de Cirugía General, al Prof. Francisco Barreiro y al Dr. Daniel Prieto, por las biopsias que se tomaron en los quirófanos.*

*En el Servicio de Anatomía Patológica y en el Departamento de Ciencias Morfológicas de la USC (Facultad de Medicina), al Prof. Andrés Beiras y la Dra. Beatriz Fernández, por los estudios anatomo-patológicos.*

## *Agradecimientos*

*- A la Dra Lourdes Loidi de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica por su ayuda en los estudios de secuenciación.*

*- A la Dra. María Jesús Díaz del Hospital Central de Asturias, al Dr. Pablo Prieto del Hospital Clínico Universitario de Salamanca, al Dr. Francisco Fernández del Hospital Puerta de Europa de Huelva, al Prof. Joaquín Lado Abeal del Departamento de Medicina Interna (Texas Tech University Health Sciences Center) por habernos cedido amablemente la información clínica y bioquímica de una parte de los pacientes.*

*- A la Dra. Giovanna Lattanzi, del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) en Bolonia (Italia), por los estudios moleculares que se llevaron a cabo en su laboratorio, y su disponibilidad a la hora de hacerle alguna consultada metodológica o de interpretación de resultados.*

*- Al Prof. Francesc Villarroya, del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Barcelona, por los estudios moleculares que se llevaron a cabo en su laboratorio.*

*-A los profesores Carlos López Otín y Glenn E. Morris por cedernos amablemente dos de los anticuerpos monoclonales utilizados en nuestros estudios, que habían sido producido en sus respectivos laboratorios.*

*-Al Dr. Hugo Gutierrez de Teran y David Rodríguez Díaz (estudiante de doctorado) de la Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, por su ayuda en parte del análisis estructural de las mutaciones.*

*-Al Prof. Labandeira-García por poner a nuestra disposición los microscopios y cámara de fotos de su laboratorio. A nuestros vecinos más cercanos, los miembros de su grupo, por atentamente facilitarme el trabajo en sus instalaciones: Pablo Rey, Jannette, Rita, Belén, Juan, Mamen y otros.*

*A la buena colaboración de los pacientes que participaron en estos estudios.*

*Al personal de la cafetería de la Facultad de Medicina de la USC: Luis, Pepe, María y otros, por hacerme más agradable el día a día, sobre todo en las jornadas más largas.*



*A todas aquellas personas que, al menos, con un pequeño gesto me han ayudado y/o apoyado durante este tiempo.*

*A mi familia de adopción:*

*Mis amigos de Coruña: Ana Saavedra, Ana Moracho, Tina, Aurita*

*Mis amigos de Santiago: Pedro, Mamen, Amparo (y familia), Noelia, nuestro grupo de Santiago, las hermanas del SCJ, Eva, Yarimar, AseQUIEL*

*Mis amigos de Holanda: Rudy, Marga, Mirjam, Marianne, Silvia*

*Mis amigos de Cerdeña: Carmen y familia*

*Mis amigos de Cuba: Hilda, Yoandra, Adrian, Maritza*

*Mi madrina que ha cumplido con “sobresaliente” su misión.*

*A mi familia:*

*Muy especialmente a mis tías Ida y Gladys por todo el apoyo moral que me han dado.*

*Mis hermanos. A Enrique por mantenerme informada de nuestros seres más queridos a miles de Km., siempre con un mensaje de aliento.*

*Mi prima Marlene y familia, por su apoyo y acogida en estas tierras.*

*Mis tías y tíos, primas y primos que estando en Cuba los siento tan presentes.*

*A mis padres, mis dos grandes amores, mi fuente de energía para seguir adelante. Por los valores que me han transmitido y por lo que me siguen motivando cada día, a pesar de la distancia geográfica.*

*A todos, GRACIAS.*



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. TEJIDO ADIPOSO.....	1
1.1.1. Embriología .....	1
1.1.2. Tipos y características histológicas.....	2
1.1.3. Localización anatómica.....	3
1.1.4. Funciones.....	5
1.1.5. Desarrollo, dimorfismo sexual e influencias hormonales .....	6
1.1.6. Diferenciación de los adipocitos.....	9
1.1.6.1. Genes/proteínas que participan en el programa de diferenciación de adipocitos.....	13
1.2. ENVOLTURA NUCLEAR.....	19
1.2.1. Membrana nuclear interna y lámina nuclear .....	20
1.2.2. Complejo de poro nuclear .....	21
1.2.3. Proteínas de la membrana nuclear, proteínas asociadas y funciones de las mismas.....	23
1.2.3.1. Proteínas integrales de membrana.....	23
1.2.3.2. Láminas.....	25
1.2.3.2.A. Procesamiento de la prelámina A .....	28
1.2.3.2.B. Interacciones y funciones de las láminas .....	29
1.3. LIPODISTROFIAS.....	35
1.3.1. Lipodistrofias adquiridas .....	35
1.3.1.1. Lipodistrofia Generalizada Adquirida (Síndrome de Lawrence).....	36
1.3.1.2. Lipodistrofia Parcial Adquirida (Síndrome de Barraquer-Simons) .....	38
1.3.1.3. Lipodistrofia adquirida relacionada con la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana.....	41
1.3.1.4. Lipodistrofias localizadas .....	43
1.3.1.4.A. Lipodistrofia localizada inducida por fármacos .....	43
1.3.1.4.B. Lipodistrofia localizada inducida por presión .....	44
1.3.1.4.C. Lipodistrofia localizada y paniculitis .....	44
1.3.1.4.D. Lipodistrofia centrífuga.....	44
1.3.2. Lipodistrofias familiares.....	45
1.3.2.1. Lipodistrofias familiares generalizadas .....	46
1.3.2.1.A. Lipodistrofia congénita generalizada (CGL).....	46
1.3.2.1.B. Lipodistrofia generalizada con inicio en la pubertad por mutaciones en LMNA .....	59
1.3.2.2. Lipodistrofias parciales.....	59
1.3.2.2.A. Lipodistrofia parcial familiar (FPL) .....	59
1.3.2.3. Lipodistrofias familiares sistémicas .....	71
1.3.2.4. Modelos animales de lipodistrofia .....	79

1.3.3. Laminopatías, posibles mecanismos .....	81
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>93</b>
<b>3. SUJETOS Y MÉTODOS .....</b>	<b>97</b>
3.1. SUJETOS .....	97
3.2. MÉTODOS .....	100
3.2.1. Diagnóstico molecular y estudio de la relación genotipo-fenotipo .....	100
3.2.1.1. Identificación de mutaciones responsables de FPLD y relación genotipo-fenotipo .....	100
3.2.2. Estudios <i>ex vivo</i> histológicos y moleculares .....	108
3.2.2.1. Estudios de microscopía óptica, inmunohistoquímica, ultraestructurales y moleculares en muestras de tejido adiposo procedentes de pacientes con FPLD2 .....	108
3.2.3. Estudios <i>in vitro</i> .....	114
3.2.3.1. Estudio funcional de la mutación C591F en el gen <i>LMNA</i> .....	114
3.2.3.2. Estudio <i>in vitro</i> del papel de las hormonas sexuales en la adipogénesis y su relación con la acumulación de prelamina A farnesilada .....	116
3.2.3.3. Estudio <i>in vitro</i> de la adipogénesis en fibroblastos primarios de un paciente con lipodistrofia congénita generalizada tipo 2 .....	118
3.2.4. Protocolos generales .....	123
3.2.4.1. Western blot .....	123
3.2.4.2. RT-PCR en tiempo real .....	126
3.2.4.3. Cultivo de células .....	128
3.2.5. Bases de datos y programas electrónicos .....	130
3.2.6. Análisis estadístico .....	130
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>133</b>
4.1. SECUENCIACIÓN DE LOS GENES <i>LMNA</i> Y <i>PPARG</i> .....	133
4.1.1. Prevalencia de mutaciones .....	133
4.1.1.1. Mutaciones encontradas en <i>LMNA</i> .....	133
4.1.1.2. Mutaciones encontradas en <i>PPARG</i> .....	161
4.1.1.3. Pacientes con sospecha de FPLD sin diagnóstico molecular .....	168
4.1.2. Prevalencia de polimorfismos .....	168
4.1.2.1. SNPs encontrados en <i>LMNA</i> .....	168
4.1.2.2. SNPs encontrados en <i>PPARG</i> .....	171
4.1.3. Correlación genotipo-fenotipo .....	172
4.1.3.1. Muestra general .....	172
4.1.3.2. Pacientes diabéticas .....	177
4.1.3.3. Pacientes menopáusicas .....	181
4.1.3.4. Pacientes no-menopáusicas .....	185
4.1.3.5. Pacientes FPLD vs. pacientes con sospecha de FPLD sin diagnóstico molecular .....	189

4.1.3.6. Pacientes_FPLD clásica vs. FPLD atípica.....	193
4.1.3.7. Pacientes con alta sospecha de FPLD vs. baja sospecha de FPLD .....	197
4.2. ESTUDIO FUNCIONAL DE LA MUTACIÓN C591F .....	201
4.3. ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES Y MOLECULARES EN MUESTRAS DE TEJIDO ADIPOSO PROCEDENTES DE PACIENTES CON FPLD2 .....	203
4.3.1. Estudio del tejido adiposo subcutáneo de pacientes con la forma clásica de FPLD2 .....	203
4.3.1.1. Evaluación clínica de los pacientes .....	203
4.3.1.2. Expresión génica en muestras de tejido adiposo.....	205
4.3.1.3. Expresión de prelamina A en muestras de tejido adiposo, evaluada por western blot e inmunofluorescencia.....	208
4.3.1.4. Estudio de ultraestructuras celulares por microscopía electrónica.....	210
4.3.2. Estudio de la lipomatosis asociada a la FPLD2.....	212
4.3.2.1. Estudios histológicos .....	212
4.3.2.2. Expresión génica .....	214
4.3.2.3. Estudios de expresión de proteínas .....	218
4.4. ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS HORMONAS SEXUALES EN LA ADIPOGÉNESIS Y SU RELACIÓN CON LA ACUMULACIÓN DE PRELAMINA A FARNESILADA. ....	222
4.4.1. Estudio morfológico de las células tratadas .....	222
4.4.2. Expresión génica y proteica.....	224
4.5. ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DE LA ADIPOGÉNESIS EN FIBROBLASTOS PRIMARIOS DE UN PACIENTE CON LIPODISTROFIA CONGÉNITA GENERALIZADA TIPO 2 Y PAPEL DE LAS GLITAZONAS.....	232
4.5.1. Tratamiento de Fibroblastos primarios en cultivo, con medio de diferenciación, en presencia o no de Pioglitazona.....	232
4.5.2. Expresión GÉNICA .....	232
4.5.3. Estudio de la Expresión de prelamina A en fibroblastos BSCL2 por análisis de inmunofluorescencia.....	235
4.5.4. Estudio de expresión génica y proteica de ZMPSTE24.....	237
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>241</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>277</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>283</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>313</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>315</b>



**ABREVIATURAS**

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AFCMe	N-Acetil-S-farnesil-L-cisteín metil ester
AGL	lipodistrofia generalizada adquirida
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
APL	lipodistrofia parcial adquirida
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BSCL, CGL	lipodistrofia congénita generalizada (síndrome de Berardinelli-Seip)
BSCL1	BSCL tipo 1 (por mutaciones en <i>AGPAT2</i> )
BSCL2	BSCL tipo 2 (por mutaciones en <i>BSCL2</i> )
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DEXA	densitometría de absorción de rayos X
CHUS	Complejo Hospitalario Universitario de Santiago
DM2	diabetes mellitus tipo 2
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle’s Médium”
DMSO	dimetilsulfóxido
DS	desviación estándar
E2	17-beta estradiol
EEII	extremidades inferiores
EES	extremidades superiores
EGF	factor de crecimiento epidérmico
ELISA	“enzyme-linked immunoassay”
EMSA	“electrophoretic mobility shift assay”
ER	retículo endoplasmático
<i>et al.</i>	forma abreviada del Latín para decir “y otros”
FBS	suero fetal bovino
FFAs	ácidos grasos libres
FPLD, FPL	lipodistrofia parcial familiar
FPLD1	FPLD tipo Kobberling
FPLD2	FPLD tipo Dunnigan

## Abreviaturas

FPLD3	FPLD tipo 3 (por mutaciones en <i>PPARG</i> )
FTI	inhibidor de farnesiltransferasa
Hb A1c	hemoglobina glicosilada
HDL	lipoproteína de alta densidad
HGPS	síndrome progeroide de Hutchinson-Gilford
HLP	hiperlipidemias
HOMA-IR	“model assessment-insulin resistance”
HTA	hipertensión arterial
IBMX	isobutilmetilxantina
IMC	índice de masa corporal
IMPs	proteínas integrales de membrana
INM	membrana nuclear interna
LAP	polipéptido asociado a la lámina nuclear
LDL	lipoproteína de baja densidad
LPL	lipoproteína lipasa
MAD	displasia mandibuloacral
MEFs	fibroblastos embrionarios de ratón
MSCs	células madre mesenquimales
NC	cresta neural
ND	no determinado
NE	envoltura nuclear
NETs	proteínas transmembrana de la envoltura nuclear
NLS	señal de localización nuclear
NPCs	complejos de poro nuclear
NRTI	nucleósidos inhibidores de la transcriptasa reversa
ns	no significativo
ONM	membrana nuclear externa
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
PDB	“Protein Data Bank”
PBS	tampón fosfato salino
PBS-T	PBS-Tween 20
PCOS	síndrome de ovario poliquístico
PCR	reacción en cadena de la polimerasa



PI	inhibidores de proteasas
PVDF	polifluoruro de vinilideno
RMN	resonancia magnética nuclear
ScaPCs	células progenitoras Sca-1+
SDS	dodesilsulfato de sodio
shRNA	“short Harper RNA”
siRNA	“short interfering RNA”, ARN de silenciamiento
SNP	polimorfismo de un nucleótido
TA	tejido adiposo
TAB	tejido adiposo blanco
TABsc	TAB subcutáneo
TAP	tejido adiposo pardo
TARGA	terapia anti-retroviral de gran actividad
TAsc	TA subcutáneo
TNF $\alpha$	factor de necrosis tumoral alfa
VIH	virus de inmunodeficiencia humana
VLDL	lipoproteína de muy baja densidad
WHR	“Waist-hip ratio”, índice cintura-cadera



# **INTRODUCCIÓN**



## 1. INTRODUCCIÓN

Las lipodistrofias familiares son un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por alteraciones en la distribución normal de la grasa corporal que conducen, a su vez, a alteraciones metabólicas y otros trastornos. Tienen un origen monogénico y se asocian a mutaciones en genes que codifican para: laminas nucleares o proteínas relacionadas con su maduración post-traducción, así como, factores de transcripción u otras proteínas relacionadas con la adipogénesis [1] [2] [3] [4] [5] [6] [7] [8] [9].

### 1.1. TEJIDO ADIPOSEO

El tejido adiposo constituye el principal depósito de energía en los mamíferos. Hasta finales del siglo pasado ésta era la única función atribuida a este tejido. Después de que en 1994 Zhang y colaboradores identificaran el gen de la leptina [10] una hormona fundamentalmente sintetizada y secretada por los adipocitos, se han ido caracterizando un gran número de proteínas con funciones endocrinas, paracrinas y autocrinas que han llevado a la modificación de este paradigma. Hoy en día, además de esta función de almacenamiento de triglicéridos, se considera al tejido adiposo como un órgano endocrino que participa en la homeostasis de la energía, la regulación del apetito, la reproducción, los procesos inflamatorios y la inmunidad [11].

#### 1.1.1. EMBRIOLOGÍA

Generalmente se describe que los adipocitos, al igual que los osteoblastos, condrocitos y mioblastos se derivan de células madre mesenquimales (MSCs), derivadas, a su vez, del mesodermo [12]. El mesodermo está formado por las regiones axial, intermedia, placa lateral y mesodermo paraxial del embrión. Se supone que cada una de estas regiones origina tejido adiposo local [13]. Origen éste que es coherente con la aparición de varias formas de lipodistrofia parcial y la expresión diferencial de genes involucrados en el desarrollo e identidad de los diferentes depósitos de grasa. En 2006, Atit y colaboradores demostraron que la grasa parda interescapular se deriva del mesodermo paraxial [14], por lo que, este tipo de grasa también parece tener un origen mesodérmico.

No obstante, se sabe que durante el desarrollo de los vertebrados superiores, el mesodermo no es la única lámina germinal fuente de células mesenquimales. Se ha descrito que en la cabeza y el cuello, la cresta neural (NC) produce precursores mesenquimales que se diferencian en células de tejido conectivo, de músculo liso vascular, tendones, dermis, odontoblastos, cartílagos y huesos [15]. La NC es una población de células en los vertebrados que se origina del neuroectodermo. Una vez que el tubo neural se cierra, las células de la NC experimentan una transición de epitelio a mesénquima y migran a diversas regiones del embrión en desarrollo, donde se diferencian en varios tipos de células.

Recientemente se han encontrado sorprendentes evidencias, en estudios con células madre embrionarias y rastreo de linajes celulares *in vivo*, sobre el origen de MSCs y adipocitos en la cresta neural [16] [13].

La diferenciación de las células pluripotentes mesenquimales hacia cada uno de los tipos de células unipotentes derivadas de las mismas está, en principio, estrictamente controlada por un gran número de mecanismos que hasta ahora son poco conocidos [17]. La adipogénesis ocurre al final del desarrollo embrionario y en períodos postnatales, mientras que la condrogénesis y osteogénesis ocurren en las primeras etapas de la embriogénesis.

### 1.1.2. TIPOS Y CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS

En los mamíferos existen dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco (TAB) y el tejido adiposo pardo (TAP), conocidos también como grasa blanca y grasa parda, respectivamente [12]. Estos están, fundamentalmente, constituidos por dos tipos de adipocitos:

Los adipocitos blancos, que son células monovaculares, contienen una gota grande de lípidos (unilocular), rodeada por una capa de citoplasma. El núcleo es aplanado y se localiza en la periferia (Figura 1.1A) La grasa almacenada lo está, principalmente, en forma de triglicéridos y ésteres de colesterol.

Los adipocitos pardos son células plurivacuolares con forma poligonal. A diferencia de los adipocitos blancos, los adipocitos pardos tienen un citoplasma grande con gotas de lípidos (multiloculares) dispersas; el núcleo es redondeado y se localiza más bien hacia el centro de la célula. El color pardo se debe a las numerosas mitocondrias y citocromos que contiene, así como a la hemoglobina presente debido a la gran vascularización [18] (Figura.1.1B).

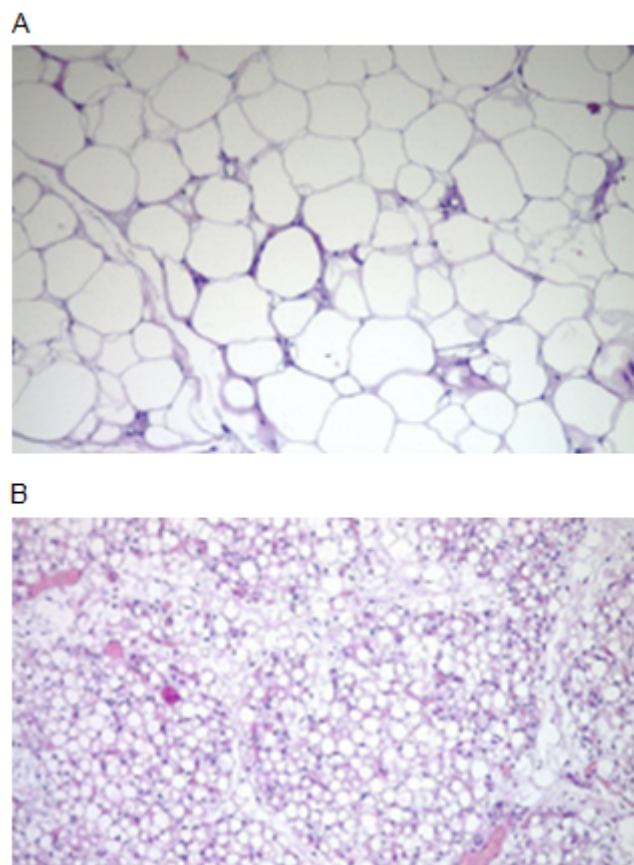


Figura 1.1: A: Tejido adiposo blanco procedente de un control sano. B: Tejido adiposo pardo procedente de un feto humano. (Cortesía de la Dra Beatriz Fernández, Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínico Universitario de Santiago)

### 1.1.3. LOCALIZACIÓN ANATÓMICA

El tejido adiposo es un único órgano que se dispone como múltiples y diferentes depósitos (contiguos y no contiguos) en todo el cuerpo (Figura 1.2). Las dos principales subdivisiones de este órgano, tejido adiposo visceral y tejido adiposo subcutáneo, se subdividen a su vez en depósitos menores definidos por la localización anatómica. Cada uno de estos depósitos tiene su propio y único ambiente de citoquinas, hormonas y factores de crecimiento que influyen en su desarrollo [19] [20].

En los roedores, el TAP es más abundante en el período neonatal y está más concentrado en la región interescapular. Por exposición al frío, los adipocitos pardos también se pueden encontrar en otras áreas, incluyendo aquellas que son depósitos típicos de TAB [21].

En los fetos y recién nacidos humanos, el TAP se encuentra en regiones axilares, cervical, interescapular, perirrenal y periadrenal [22] (Figura 1.2), pero disminuye rápidamente después

del nacimiento y ha sido tradicionalmente considerado insignificante en adultos, excepto quizás en pacientes con feocromocitoma, donde la actividad adrenérgica es extremadamente alta [23] o en trabajadores al aire libre en climas nórdicos sujetos a exposición prolongada al frío [24]. Sin embargo, recientes estudios morfológicos y de tomografía axial computarizada y tomografía de emisión de positrones (PET) han demostrado que la grasa parda en humanos podría no ser tan escasa como se piensa [25] [26].

En humanos el TAB está disperso por todo el cuerpo, con los depósitos intra-abdominales más importantes alrededor del omentum (epiplones), intestinos y áreas perirenales; así como depósitos subcutáneos en las nalgas, caderas, extremidades y tronco (Figura 1.2). Además, se puede encontrar en muchas otras áreas, incluyendo el espacio retro-orbital, la cara, regiones interarticulares, palmas y plantas y en la médula ósea (Figura 1.2) [12].

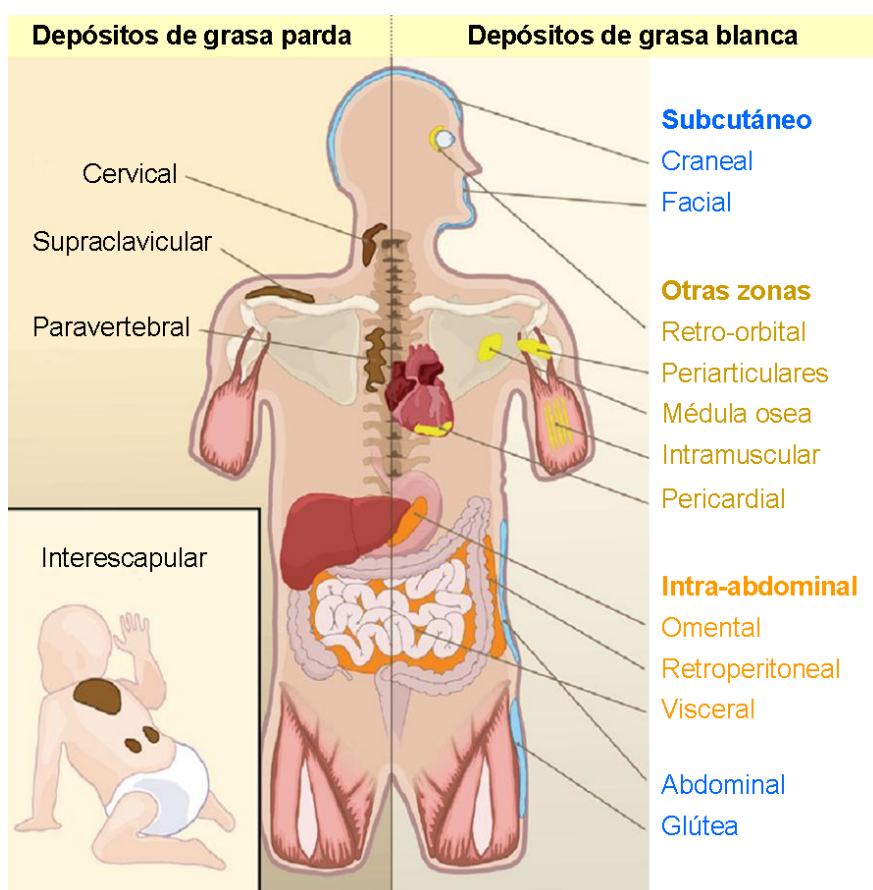


Figura 1.2: Distribución del tejido adiposo en humanos. (Adaptada de: Gesta *et al.*, 2007 [12])



#### 1.1.4. FUNCIONES

Además de las funciones de aislamiento y soporte mecánico, el tejido adiposo ha sido tradicionalmente definido como el principal sitio de almacenamiento de energía excedente. Las dos principales funciones del TAB son el almacenamiento de energía en forma de triglicéridos, en gotas uniloculares, y su liberación en forma de ácidos grasos libres (FFAs). Por su parte, el TAP almacena triglicéridos en adipocitos multiloculares como energía de rápido acceso para producir calor a través del desacoplamiento mitocondrial de la fosforilación de FFAs. Los adipocitos blancos expresan una maquinaria selectiva de este tipo de células necesaria para la síntesis de triglicéridos a partir de ácidos grasos procedentes de lipoproteínas, la captación de glucosa, así como la lipólisis de los triglicéridos almacenados en forma de pequeñas gotas [27].

El tejido adiposo es además el mayor órgano endocrino. Produce adipoquinas como TNF $\alpha$ , leptina, resistina, RBP4 y adiponectina entre otras, que modulan el metabolismo sistémico. Esta función endocrina no es selectiva de los adipocitos blancos ya que muchos de estos factores están también presentes en los adipocitos pardos y en otras células que forman parte del tejido adiposo como los macrófagos [28] [12] [29].

Además de los adipocitos, el tejido adiposo contiene una matriz de tejido conectivo, tejido nervioso, células de defensa y células estroma-vasculares. Estos componentes funcionan como una unidad integrada, haciendo del tejido adiposo un verdadero órgano endocrino [30] [31].

La fracción estroma-vascular contiene pericitos y células endoteliales, monocitos, macrófagos y precursores de los adipocitos con distintos grados de diferenciación, fundamentalmente fibroblastos; aunque también aparecen preadipocitos y células mesenquimales pobremente diferenciadas [32] .

Se piensa que las células no-adipocitarias pueden ser la fuente principal de algunos factores que secreta el tejido adiposo. Dichos factores (particularmente procedentes de depósitos de TAB) pueden tener efectos sobre múltiples sistemas biológicos, incluyendo la homeostasis de energía (metabolismo lipídico y de los carbohidratos, apetito, termogénesis), el sistema inmune, la función reproductora, la hemostasia, el control de la presión sanguínea y la angiogénesis [27].

Se sabe que la grasa parda también se utiliza para generar calor. Esta función especializada de los adipocitos pardos deriva de su mayor contenido en mitocondrias y de la capacidad para desacoplar la respiración celular a través de la acción de la proteína desacopladora 1 (“uncoupling protein1”, UCP1) [33].

#### 1.1.5. DESARROLLO, DIMORFISMO SEXUAL E INFLUENCIAS HORMONALES

La distribución y función de la grasa en humanos varía considerablemente a lo largo de la vida. La masa de tejido adiposo aumenta durante la mediana edad y declina en la vejez [34] [35]. La grasa se redistribuye entre diferentes depósitos conforme avanza el tiempo, especialmente durante y después de la mediana edad, redistribuyéndose desde los depósitos subcutáneos a los viscerales (intra-abdominales) [36].

En concordancia con este comportamiento, el porcentaje de grasa proveniente de la dieta, almacenada en depósitos subcutáneos es menor en hombres y mujeres mayores que en jóvenes, y la circunferencia abdominal aumenta en unos 4.0 cm cada 9 años en mujeres adultas [37] [38].

En edades avanzadas, la grasa se redistribuye fuera de los depósitos, acumulándose en la médula ósea, músculo, hígado y otras zonas ectópicas. Como sucede en el envejecimiento, muchos de los síndromes lipodistróficos genéticos o adquiridos están asociados con disfunción del tejido adiposo, pérdida de grasa subcutánea, incremento de grasa visceral y ectópica, y síndrome metabólico (obesidad central, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, dislipidemia e hipertensión) [39].

Los preadipocitos representan el 15-50 % de las células en el tejido adiposo y dan lugar a nuevos adipocitos. Con la edad disminuye la proliferación y diferenciación de los mismos, lo que al parecer contribuye a incrementar la exposición sistémica a ácidos grasos libres lipotóxicos. La inflamación de bajo grado del tejido adiposo relacionada con la edad está asociada a cambios en preadipocitos y macrófagos, cambios que se producen de un modo dependiente del depósito de grasa. Este proceso inflamatorio crónico de bajo grado asociado con la edad conduce frecuentemente a una reducción adicional de la adipogénesis, más lipotoxicidad y activación de rutas de estrés celular que, a su vez, exacerban la respuesta inflamatoria de preadipocitos y células del sistema inmunitario, estableciendo ciclos de auto-perpetuación que conducen a disfunción sistémica [40].

En los seres humanos, los patrones de distribución de grasa corporal son sexualmente dimórficos [41]. Las mujeres se caracterizan generalmente por mayores porcentajes de grasa corporal comparadas con los hombres, quienes proporcionalmente tienen mayor masa ósea y muscular [42] [43] [44] [45]. Respecto a la topografía, los hombres normalmente se caracterizan por un patrón de grasa corporal central, con acumulación adiposa en la región abdominal, mientras que las mujeres generalmente presentan un patrón de grasa corporal periférico, con una mayor proporción de tejido adiposo en las regiones glútea y femoral. La cantidad de grasa localizada dentro de la cavidad abdominal, llamada intrabdominal o grasa visceral, que incluye la grasa omental, mesentérica y retroperitoneal [46], se encuentra en cantidad significativamente mayor en los hombres comparados con las mujeres [42]. Sin embargo, dentro de un mismo sexo, se han encontrado grandes variaciones interindividuales en la cantidad de grasa visceral. En ambos sexos, la gran acumulación de tejido adiposo visceral es un determinante crítico de las alteraciones metabólicas relacionadas con la obesidad, lo que incrementa el riesgo de diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular [47] [48]. De hecho, la obesidad abdominal-visceral está reconocida como la manifestación característica del síndrome metabólico [49].

El tejido adiposo está estrechamente regulado por la actividad metabólica de muchas hormonas. Cada hormona tiene un efecto peculiar de acuerdo a la expresión de su respectivo receptor y esto varía según la edad, el sexo y la localización anatómica. En los hombres, la obesidad abdominal ha sido usualmente asociada con bajos niveles de testosterona en plasma [50] [51] [52]. Diferentes estudios a través de tomografía computarizada, resonancia magnética, entre otras técnicas de imagen, han confirmado que concentraciones bajas de testosterona en plasma se encuentran asociadas frecuentemente con una acumulación de grasa visceral [53] [54] [55]. Sin embargo, la fertilidad no está comprometida en los varones obesos, y ésta puede verse afectada sólo en casos extremos de obesidad [56].

En las mujeres, la asociación entre andrógenos circulantes y la obesidad abdominal es más compleja. Al contrario de los hombres, se piensa generalmente que las mujeres con obesidad abdominal son hiperandrogénicas [57]. Esta idea se basa fundamentalmente en la siguiente observación: mujeres con el síndrome de ovario poliquístico (PCOS) muestran hiperandrogenismo, a menudo asociado con obesidad abdominal e hiperinsulinemia [58]. Sin embargo, la asociación entre niveles de andrógenos endógenos y obesidad abdominal en mujeres es aún poco conocida [59].

Por otro lado, se ha descrito que en las mujeres la deficiencia de estrógenos inducida por la menopausia está asociada a un incremento en la acumulación de tejido adiposo visceral [60] [61] [62].

En las mujeres premenopáusicas las células granulosas ováricas producen estradiol, mientras que la placenta secreta estriol y estradiol [63]. Tanto en los hombres como en las mujeres, el tejido adiposo produce estrona [64], y una parte sustancial de la estrona posteriormente es transformada en estradiol en la periferia [65] [66] por la acción de la enzima aromatasa P450 (P450<sub>arom</sub>) [67]. El tejido adiposo es la principal fuente de síntesis de estrógenos en los hombres, así como en las mujeres postmenopáusicas, en las cuales la síntesis ovárica de estrógenos es insignificante [65] [68] [69].

La enzima P450<sub>arom</sub> presente en el tejido adiposo convierte los andrógenos androstendiona y testosterona en los estrógenos estradiol y estrona, respectivamente. MacDonald y colaboradores observaron que en ambos sexos [70] hay un incremento progresivo en la actividad de esta enzima a medida que avanza la edad y en la obesidad. Posteriormente, otros investigadores observaron que en las mujeres, la expresión de P450<sub>arom</sub> en TA de abdomen, caderas y muslos, aumenta con la edad independientemente de la masa adiposa corporal [71]. Estos últimos también demostraron que existen claras diferencias regionales en la expresión de P450<sub>arom</sub>, siendo los niveles más altos en las caderas, seguidos por el muslo y los más bajos en el abdomen [71].

Las claras diferencias en la distribución de la grasa corporal entre sexos y las hormonas sexuales (andrógenos y estrógenos) tienen un importante papel en la generación y distribución del tejido adiposo, con un balance entre los niveles de estrógenos y testosterona circulantes de aparente importancia [72]. Sin embargo, la medición de los esteroides circulantes puede no reflejar la producción y acción local dada la capacidad del tejido adiposo para expresar ciertas enzimas que metabolizan esteroides, y por tanto, modulan las concentraciones de los mismos dentro del propio tejido [73]. De modo similar, el principal glucocorticoide en humanos, el cortisol, está involucrado en la distribución de la grasa [74].

Varios estudios han demostrado que el cortisol producido localmente en el tejido adiposo por la enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (HSD11B1), a partir de la cortisona inactiva, tiene un papel clave en la etiología de la obesidad visceral y el síndrome metabólico [75] [76] [77]. Esta enzima es capaz de amplificar las concentraciones locales de cortisol sin

alterar significativamente los niveles circulantes. Además, se ha demostrado que el ARNm de HSD11B1 está presente en niveles más elevados en tejido omental con respecto al tejido adiposo subcutáneo en adultos [78] [79].

Los adipocitos son células que responden al estímulo de la insulina. La insulina promueve el almacenamiento de los triacilglicerolos en los adipocitos por varios mecanismos, entre los que se incluyen el fomento de la diferenciación de preadipocitos a adipocitos y el estímulo de la síntesis y el transporte de la glucosa y los triacilglicerolos, así como la inhibición de la lipólisis en los adipocitos maduros. La insulina y los glucocorticoides representan el principal estimulante fisiológico de la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL); esta asociación juega un papel importante en la topografía de la grasa corporal [80].

#### 1.1.6. DIFERENCIACIÓN DE LOS ADIPOCITOS

Los adipocitos son las principales células que componen el tejido adiposo, cuya función primordial es el almacenamiento de energía. Se han descrito distintos intermediarios celulares entre las células madre mesenquimales y los adipocitos maduros, pero ha sido difícil caracterizarlos a nivel molecular. Por este motivo, con fines prácticos se describe la adipogénesis en dos fases: la primera, conocida como compromiso, comprende el compromiso de la célula madre pluripotente hacia la línea celular de adipocito. Se produce una conversión de la célula madre en preadipocito, el cual no se puede distinguir morfológicamente de su precursor pero ha perdido el potencial para diferenciarse en otro tipo de célula. En la segunda fase, conocida como diferenciación terminal del adipocito o propiamente adipogénesis, el preadipocito toma las características de adipocito maduro (Figura 1.3). Éste, a su vez, adquiere la maquinaria que es necesaria para el transporte y síntesis de lípidos, el aumento de la sensibilidad a la insulina y la secreción de proteínas específicas de los adipocitos [81].

## **Compromiso**

Aunque no se conoce bien el número exacto de etapas entre una célula madre mesodérmica/mesenquimal (MSC) y un adipocito maduro, se cree que la MSC da lugar a un primer precursor común, el adipoblasto, que origina preadipocitos blancos y pardos comprometidos; éstos, a su vez, bajo condiciones estimuladoras adecuadas se diferencian en adipocitos maduros de diferentes tipos.

Como estos precursores no poseen una característica morfológica o marcadores de expresión génica únicos, aun está por definir si existen por separado adipoblastos y/o preadipocitos para grasa blanca y parda o si existen diferentes preadipocitos para los diferentes depósitos de tejido adiposo blanco.

Estudios recientes sugieren que la grasa parda y el músculo esquelético podrían compartir un ancestro celular común durante el desarrollo [14] [82] [82]. Este precursor común expresa un marcador de miogénesis que no está presente en la grasa blanca ni en el linaje de adipocitos pardos que aparecen en el TAB sometido a estimulación adrenérgica [82] [83], lo cual hace sugerir que el TAP y el TAB podrían tener un origen diferente, y que los adipocitos pardos que se desarrollan en el TAB en respuesta a una señalización beta-adrenérgica tienen un origen independiente al de los clásicos depósitos de TAP que se desarrollan antes del nacimiento.

Sin embargo, en un estudio aún más reciente Schulz y colaboradores aislaron una subpoblación de progenitores adipogénicos, llamada “Sca-1+ progenitor cells” (ScaPCs), que reside en el TAP, TABsc y músculo esquelético murinos. Las células ScaPCs derivadas de diferentes tejidos poseen patrones de expresión molecular y capacidades adipogénicas únicas. Aunque las ScaPCs son constitutivamente progenitores comprometidos de adipocitos pardos en el TAP, en el músculo esquelético y en el TABsc son altamente inducibles a diferenciarse en adipocitos pardos bajo un determinado estímulo. Estos autores encontraron además que preadipocitos humanos aislados de TABsc muestran una mayor capacidad de inducción para convertirse en adipocitos pardos, al compararlos con células aisladas de TAB mesentérico u omental [84].

Por otro lado, varios estudios han demostrado que una estimulación adrenérgica, como la aclimatación al frío, no sólo activa a adipocitos pardos en el TAP sino también induce la aparición de adipocitos pardos en el TAB [85] [86] [87]. Sin embargo, el origen de estos adipocitos pardos que aparecen en el TAB no está aún claro.

Existen numerosas evidencias de que adipocitos blancos maduros, incluyendo adipocitos humanos, pueden convertirse en células con aspecto de adipocitos pardos, y que el típico fenotipo de almacenamiento de ácidos grasos del TAB puede ser alterado dando lugar al fenotipo de utilización de grasa (típico del TAP) a través de un proceso conocido como transdiferenciación [88] [89] [90] [91]. En un estudio muy reciente, Barbatelli y colaboradores demostraron que la formación de adipocitos pardos inducida por el frío en depósitos de TAB de ratón está determinada fundamentalmente por transdiferenciación de adipocitos blancos a adipocitos pardos [91]. Estos autores encontraron además que después de la exposición al frío, los adipocitos con alta expresión de la proteína UCP1, clásico marcador de grasa parda, presentaban una morfología intermedia entre adipocitos blancos y pardos.

Está bien establecido que la estimulación  $\beta$ -adrenérgica, como la aclimatación al frío, induce además la aparición de adipocitos pardos por adipogénesis de novo [85] [92] [86] [87]. Barbatelli y colaboradores también encontraron que la transdiferenciación depende de la activación del adrenoreceptor  $\beta_3$ , mientras que el compromiso de los preadipocitos está mediado por el adrenoreceptor  $\beta_1$  [91].

### **Diferenciación terminal del adipocito**

La diferenciación terminal del adipocito o diferenciación de los preadipocitos en adipocitos maduros, consta de dos principales eventos: el reclutamiento y proliferación de preadipocitos seguido por la subsecuente diferenciación en adipocitos maduros, [93] [94] [95]. Durante la proliferación, los preadipocitos se replican para incrementar el número de adipocitos; mientras que en la diferenciación, los preadipocitos no diferenciados (con aspecto de fibroblastos que se están dividiendo), se transforman en células esféricas, llenas de lípidos (Figura 1.3), en las que se detiene permanentemente el ciclo celular y funcionalmente son adipocitos maduros [93]. La diferenciación va acompañada por dramáticas alteraciones en la forma de la célula, así como cambios moleculares que conducen a un marcado incremento en la capacidad de la célula para sintetizar lípidos y para la respuesta hormonal específica, permitiendo al adipocito asumir su papel especializado en la homeostasis de la energía [94] [96].

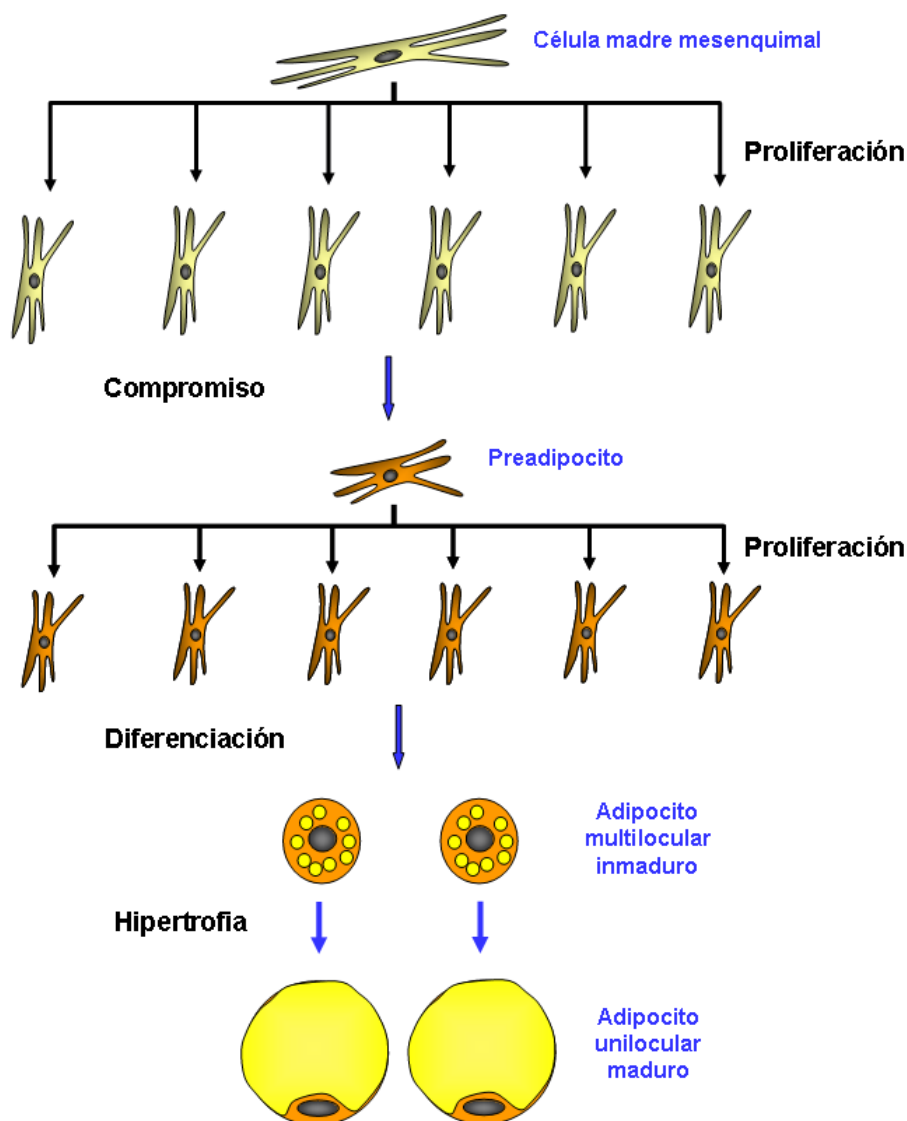


Figura 1.3: Adipogénesis: proliferación y diferenciación. (Adaptada de: Avram *et al.*, 2007 [17])

La diferenciación de los adipocitos representa un complejo proceso que depende de una regulación temporal estricta de múltiples eventos de señalización estimuladores o inhibidores, que involucran reguladores del ciclo celular y factores de diferenciación [97]. La suma de esta red de eventos es lo que conduce finalmente a la expresión de varios cientos de genes asociados, así como al incremento de la capacidad de la célula para sintetizar lípidos [98] [99] [100]. Los factores de transcripción actúan cooperativamente y secuencialmente para promover las etapas necesarias que conducen el programa adipogénico.

La adipogénesis ha sido extensamente estudiada en las líneas celulares de ratón 3T3-L1 y 3T3-F442A y en líneas celulares de preadipocitos pardos inmortalizados [101]. La transición de preadipocitos a adipocitos consta de cuatro etapas: parada del crecimiento, expansión clonal, diferenciación inicial y diferenciación terminal. Estas etapas son dirigidas por una



cascada transcripcional en la que están involucrados, entre otros factores de transcripción, el receptor nuclear PPAR $\gamma$  (“peroxisome proliferator activated receptor-gamma”) y miembros de la familia c/EBPs (“CCAAT/enhancer-binding protein”) (Figura 1.4) [97].

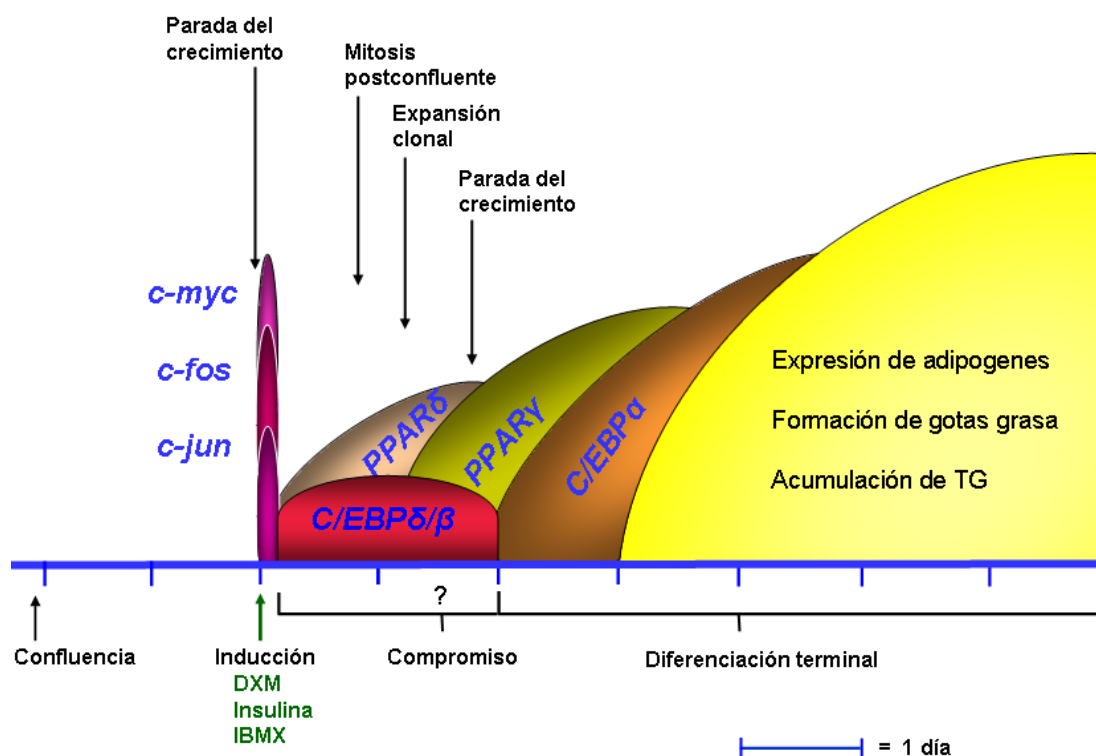


Figura 1.4: Diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1. Principales eventos identificados, en orden cronológico. Expresión génica, representación de los principales genes involucrados. DXM: dexametasona, IBMX: isobutilmetilxantina. (Adaptada de: Avram *et al.*, 2007 [17])

#### 1.1.6.1. Genes/proteínas que participan en el programa de diferenciación de adipocitos

Basado en modelos *in vitro*, cada etapa de la diferenciación del adipocito ha sido bien establecida y está asociada con patrones específicos de la expresión génica (Figura 1.4).[93] [94] [102] [103] [99]. Sin embargo, los mecanismos que conducen a la proliferación preconfluente y a la parada del crecimiento son menos conocidos.

Los preadipocitos 3T3-L1 confluentes se diferencian por exposición a los inductores adipogénicos: suero fetal bovino (FBS), dexametasona, isobutilmetilxantina (IBMX) e insulina. Este cóctel activa un programa adipogénico que transcurre en dos fases bien definidas. Las células estimuladas se reincorporan al ciclo celular (de G0 a G1) y se dividen al menos dos veces, fase frecuentemente llamada de expansión clonal. Durante este tiempo, las células expresan factores de transcripción adipogénicos específicos, así como reguladores del ciclo celular, que juntos facilitan la expresión de PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$  (Figura 1.4). A su vez,

PPAR $\gamma$  activa promotores de genes necesarios para la conversión adipogénica [104] [105] [106]. Es entonces cuando las células comprometidas experimentan la diferenciación final que se manifiesta por la producción de gotas de lípidos así como la expresión de múltiples programas metabólicos característicos de adipocitos maduros.

### **Pref-1**

Pref-1 es una proteína transmembrana, con motivos estructurales de tipo EGF en el dominio extracelular. Los elementos repetidos EGF están relacionados con proteínas que afectan al crecimiento y a la diferenciación. La expresión constitutiva de Pref-1 inhibe la diferenciación de adipocitos y en ausencia de Pref-1 se acelera/incrementa el grado de diferenciación de adipocitos en células en cultivo [107] [108]. Los niveles de ARNm y de proteína Pref-1 son altos en preadipocitos 3T3-L1, pero dicha expresión disminuye durante la diferenciación de los adipocitos y está ausente en adipocitos maduros. Es por ello que Pref1 se utiliza como un marcador de preadipocitos [107] [108].

Los elementos específicos sobre los que actúa Pref-1 o su función en el compromiso/diferenciación de las células mesenquimales no se conoce. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que Pref-1 inhibe la diferenciación de adipocitos por estimulación de la expresión de Sox9. La proteína Sox9 se une directamente a las regiones promotoras de C/EBP $\delta$  y C/EBP $\beta$ , suprimiendo la actividad promotora y como consecuencia, impidiendo la diferenciación de los adipocitos. Se demostró además, que Sox9 es un elemento diana de Pref-1, y que Pref-1 dirige a las células multipotentes mesenquimales hacia el tipo condrogénico mientras que inhibe la diferenciación en adipocitos [109].

### **Proto-oncogenes**

En la primera hora después de añadir el medio de diferenciación a las células 3T3-L1 se ha observado la expresión de los proto-oncogenes c-fos, c-jun, c-myc, y los factores de transcripción C/EBP $\delta$  y C/EBP $\beta$  [110] [111] [112] (Figura 1.4). C-myc ha sido implicado en la capacidad de los preadipocitos para responder a señales que estimulan la replicación del ADN (mitogénesis) [113]. Dado el papel de las proteínas c-Fos y c-Jun en otros sistemas, se piensa que también poseen propiedades mitogénicas. Se ha visto también que la expresión transitoria de c-fos, c-jun y c-myc se disipa entre las 2 y 6 horas después de la inducción [112].

## **pRB**

La proteína del retinoblastoma (pRB) y sus proteínas asociadas p107 y p130 componen la llamada familia “pocket proteins”, familia del retinoblastoma o reguladores del ciclo celular [114] [115] [116]. Estas proteínas son bien conocidas por su papel en la restricción de la transición G1-S a través de la regulación de los genes diana de E2F. La proteína pRB y el par p107/p130 son necesarias para la represión de distintos grupos de genes relacionados con la proliferación celular, potencialmente a través de sus interacciones selectivas con los factores de transcripción E2Fs, comprometidos con elementos específicos del promotor en dichos genes [117]. La fosforilación de pRb por el complejo ciclina D/CDK 4 y 6 lleva a la desrepresión de E2F y a la inducción de sus genes diana necesarios para la entrada en la fase S del ciclo celular [115]. Además, las “pocket proteins” contribuyen a silenciar estos genes diana de E2Fs en células que experimentan senescencia o diferenciación [118].

Los factores de transcripción de la familia E2F y las llamadas “pocket proteins” asociadas constituyen las proteínas del ciclo celular que más notablemente regulan el programa adipogénico [97].

## **C/EBPs**

La familia C/EBP consta de cinco miembros diferentes, C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ , C/EBP $\gamma$  y CHOP. Durante la diferenciación de adipocitos, se observa una expresión secuencial de estos factores, donde la expresión temprana de C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  promueve la expresión de C/EBP $\alpha$  y C/EBP $\gamma$  [97]. Se piensa que C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  tienen un importante papel como iniciadores de la mitosis postconfluencia y la expansión clonal durante la adipogénesis [119] [120]. Tanto C/EBP $\beta$  como C/EBP $\delta$  son inducidos rápidamente por glucocorticoides al adicionar el cóctel adipogénico [111]. Ambos genes, C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$ , parecen tener un importante papel para el desarrollo del tejido adiposo. Se ha visto que ratones con C/EBP $\beta$ -nulo o C/EBP $\delta$ -nulo presentan defectos leves en el desarrollo del tejido adiposo. Fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) y ratones carentes de ambas proteínas presentan notables defectos primarios en la adipogénesis y el desarrollo del tejido adiposo [121]. C/EBP $\alpha$  se expresa más tarde en la diferenciación terminal y es diana directa de C/EBP $\beta$  [122].

Aunque ambos, C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$ , controlan la diferenciación de adipocitos, PPAR $\gamma$  parece ser dominante. Así, la expresión forzada de PPAR $\gamma$  permite recuperar la diferenciación de

MEFs carentes de C/EBP $\alpha$  a adipocitos, mientras que la expresión forzada de C/EBP $\alpha$  no hace posible que se recupere la diferenciación en MEFs carentes de PPAR $\gamma$  [106].

El proceso de diferenciación adipocitaria está, además, modulado por una serie de reguladores anti-adipogénicos que incluyen C/EBP $\beta$ -LIP y la proteína homóloga de C/EBP (“C/EBP homologous protein”, CHOP). Anterior a estos factores anti-adipogénicos (en la cascada transcripcional) se encuentra la proteína CUGBP1 que controla la traducción alternativa de las isoformas adipogénica (LAP) y anti-adipogénica (LIP) de C/EBP $\beta$ , llevando a un incremento en la producción de LIP [123].

### **CUGBP1**

CUGBP1 forma parte de la familia de proteínas de unión al ARNm, “mammalian CELF/Bruno-like RNA-binding proteins”. CUGBP1 participa en el control de la traducción y de la estabilidad del ARN. Esta función puede realizarla en la región UTR 5', como es el caso de C/EBP $\beta$ , o en la región UTR 3'. En la región UTR 3', CUGBP1 regularía la degradación del ARNm mediante su unión específica al denominado elemento rico en GU (GRE), cuya secuencia es UGUUUGUUUGU [124] [125]. La capacidad de los preadipocitos para transformarse en adipocitos maduros decrece con la edad. En preadipocitos procedentes de animales viejos la expresión de PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  y C/EBP $\delta$  está disminuida, mientras que la expresión de factores anti-adipogénicos, C/EBP $\beta$ -LIP y CHOP, aumenta. La relación entre C/EBP $\beta$ -LIP (anti-adipogénico) y C/EBP $\beta$ -LAP (pro-adipogénico) está regulada por la proteína CUGBP1, cuya expresión y actividad de unión a nucleótidos aumenta con la edad [123] [126] [127].

### **PPAR $\gamma$**

La proteína “peroxisome proliferator activated receptor-gamma” (PPAR- $\gamma$ ), es un factor de transcripción descrito por primera vez en mamíferos en 1993 como un receptor huérfano [128]. PPAR- $\gamma$  forma un heterodímero con otro receptor nuclear, “retinoid X receptor alpha” (RXR $\alpha$ ). Por activación de este complejo, PPAR- $\gamma$  se une a elementos de respuesta en el promotor de los genes diana, induciendo la expresión de dichos genes [129].

PPAR $\gamma$  juega un importante papel en la adipogénesis y se ha demostrado que es necesario y suficiente para la diferenciación de adipocitos. PPAR $\gamma$  también parece ser necesario para el mantenimiento del estado terminal de la diferenciación de los adipocitos. La expresión de un

receptor PPAR $\gamma$  dominante negativo (receptor PPAR $\gamma$  mutado que afecta la función del receptor *wild type* por interferencia directa, como puede ser la competencia por la unión al ADN)\_en células 3T3-L1 diferenciadas induce desdiferenciación con pérdida de la acumulación de lípidos y disminución en la expresión de marcadores de adipocitos [130]. De igual modo, la inactivación de PPAR $\gamma$  en adipocitos maduros *in vivo* conduce a la muerte tanto de los adipocitos pardos como blancos [131]. Existen dos isoformas de PPAR $\gamma$  (PPAR $\gamma$ 1 y PPAR $\gamma$ 2) que se generan por *splicing* alternativo y uso diferencial del promotor del gen de PPAR $\gamma$ . Aunque ambos se expresan en adipocitos, PPAR $\gamma$ 2 es el que se considera un marcador específico de grasa. Sin embargo, se ha visto que ratones con línea germinal de PPAR $\gamma$ 2 inactivado, aún tienen algún TAB, lo que sugiere que PPAR $\gamma$ 1 podría compensar la pérdida de PPAR $\gamma$ 2. Los ratones con PPAR $\gamma$  inactivado presentan también resistencia a la insulina, lo que sugiere un papel para este factor de transcripción en el mantenimiento de la sensibilidad a la insulina, independiente de sus efectos sobre la adipogénesis [81]. En el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 se utilizan agonistas farmacológicos de PPAR $\gamma$  en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 mejorando el control metabólico al reducir la resistencia periférica a la insulina [132].

### SREBP1

La proteína SREBP1 o SREBP-1c, “sterol response element-binding protein-1c”, con estructura de cremallera de leucina hélice-giro-hélice, fue identificada como un factor de transcripción pro-adipogénico que induce la expresión de PPAR $\gamma$  y provoca su activación al generar un ligando endógeno [133] [134]. SREBP1 también media la inducción de la biosíntesis de lípidos por la insulina en adipocitos [135]. Una vez activada por la insulina en la fase postprandial, SREBP1 activa una cascada de genes necesarios para la lipogénesis endógena y la diferenciación de preadipocitos [133]. SREBP1 o ADD-1 (en ratones), parece ser inducida al inicio de la adipogénesis en una ruta metabólica paralela a la de PPAR $\gamma$  y en una etapa posterior a C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  [97] .

### CREB

Los estudios de Zhan y colaboradores, en 2004, proporcionaron evidencias convincentes de que la proteína CREB, “cAMP regulatory element-binding protein”, la cual es activada al inicio de la adipogénesis en células 3T3-L1, participa en la inducción de la expresión de C/EBP $\beta$  [119]. Esta observación es coherente con anteriores estudios que mostraron el papel

de la señalización de AMPc para controlar la expresión de C/EBP $\beta$  [110]; y explica además, la necesidad de inductores de AMPc, como el IBMX, en el cóctel que inicia el programa adipogénico.

### **Krox20**

La proteína Krox20 (también conocida como “early growth response 2 protein”, Egr2) es un factor de transcripción con 3 elementos repetitivos de dedos de zinc, que se induce inmediatamente después de exposición a mitógenos, cuando los preadipocitos confluentes se reincorporan al ciclo celular. Krox20 ha sido identificada como un factor que actúa al inicio del programa adipogénico y parece contribuir a la inducción de la expresión de C/EBP $\beta$  [97]. Krox20 se activa al inicio en el programa adipogénico de células 3T3-L1 y no sólo promueve la expresión de C/EBP $\beta$  sino también coopera con C/EBP $\beta$  para facilitar la adipogénesis terminal [136].

### **KLF5**

La proteína “Krüppel-like factor 5” (KLF5) es un factor de transcripción clave en la red de factores de transcripción que controlan la diferenciación de los adipocitos. La expresión de KLF5 es inducida por C/EBP $\beta$  y  $\delta$ . KLF5, a su vez, actúa en conjunto con C/EBP $\beta$  y  $\delta$  para activar el promotor de PPAR $\gamma$ 2 [137].

### **Ciclinas**

Las ciclinas tipo D fueron caracterizadas por primera vez por su capacidad para coordinar la progresión del ciclo celular a través de la fase G1. Las ciclinas D1, D2, y D3 se unen y activan a las quinasas ciclina-dependientes 4 y 6 (CDKs 4 y 6), dirigiendo la fosforilación de la proteína del retinoblastoma y sus proteínas asociadas p107 y p130 [138] [139] [140].

Además de este papel bien definido de las ciclinas tipo D como centro de la maquinaria del ciclo celular, se ha descrito su potencial papel en otros procesos celulares como el control transcripcional y la diferenciación. Fajas y colaboradores, en 2005, demostraron que la expresión de ciclina D3 está regulada positivamente durante las etapas terminales de la adipogénesis y funciona como un coactivador ligando-dependiente de PPAR $\gamma$ . Éste, junto con la enzima quinasa dependiente de ciclina correspondiente, fosforila el dominio A-B del receptor nuclear [141]. La expresión disminuida de ciclina D3 reduce la actividad de PPAR $\gamma$  y subsecuentemente la adipogénesis, mientras que la sobre-expresión de ciclina D3 produce un efecto contrario [141].

Un efecto opuesto se ha demostrado para ciclina D1, que reprime la actividad de PPAR $\gamma$  e inhibe la diferenciación de los adipocitos [142].

### **p53**

La proteína p53 es un factor de transcripción que se une al ADN para activar la transcripción de un amplio rango de genes involucrados en el bloqueo del avance del ciclo celular o de la eliminación de células con un daño o alteración genética, a través de la apoptosis. Se ha estimado que la señalización aberrante de p53 está involucrada en al menos el 50% de los cánceres humanos [143] [144]. Por este papel de p53 en la prevención de neoplasias se le ha denominado el “guardián del genoma” [145].

Se ha descrito que p53 es un regulador negativo de la adipogénesis a través de su capacidad para detener la progresión del ciclo celular. En el caso de la diferenciación adipocitaria, parece bloquear la producción del ligando de PPAR $\gamma$  [146]. Saleem y colaboradores demostraron que el ligando y coactivador metabólico de PPAR $\gamma$ , “PPAR $\gamma$  coactivator” (PGC)-1 $\alpha$ , es una diana transcripcional de p53 [147].

## **1.2. ENVOLTURA NUCLEAR**

Se ha visto que mutaciones en proteínas de la membrana nuclear, laminas o proteínas de los complejos de poro nuclear (CPNs) originan un amplio rango de enfermedades hereditarias llamadas nucleopatías (por mutaciones en las proteínas de la membrana nuclear interna o en los CPNs) o laminopatías (por mutaciones en las laminas) [148]. Estas enfermedades incluyen, entre otros, síndromes de lipodistrofia parcial, lipodistrofia parcial asociada a displasia mandíbuloacral y síndromes progeroides que cursan con escasa grasa subcutánea [149].

Las células eucariotas se caracterizan por la presencia de núcleo. Éste encierra los cromosomas y es el lugar de replicación del ADN, de la transcripción, así como del procesamiento y ensamblaje de los pre-ribosomas. La envoltura nuclear (NE) delimita el núcleo del citoplasma y está compuesta por la membrana interna (INM) y la membrana externa (ONM), separadas por un espacio luminal que se continúa con el lumen del retículo endoplasmático (ER), ver Figura 1.5. La comunicación entre el nucleoplasma y el citoplasma tiene lugar a través de poros en la envoltura nuclear, donde convergen las membranas interna

y externa. En estos poros están los complejos de poro nuclear (NPCs), los cuales regulan el tránsito de macromoléculas entre el núcleo y el citoplasma [150] .

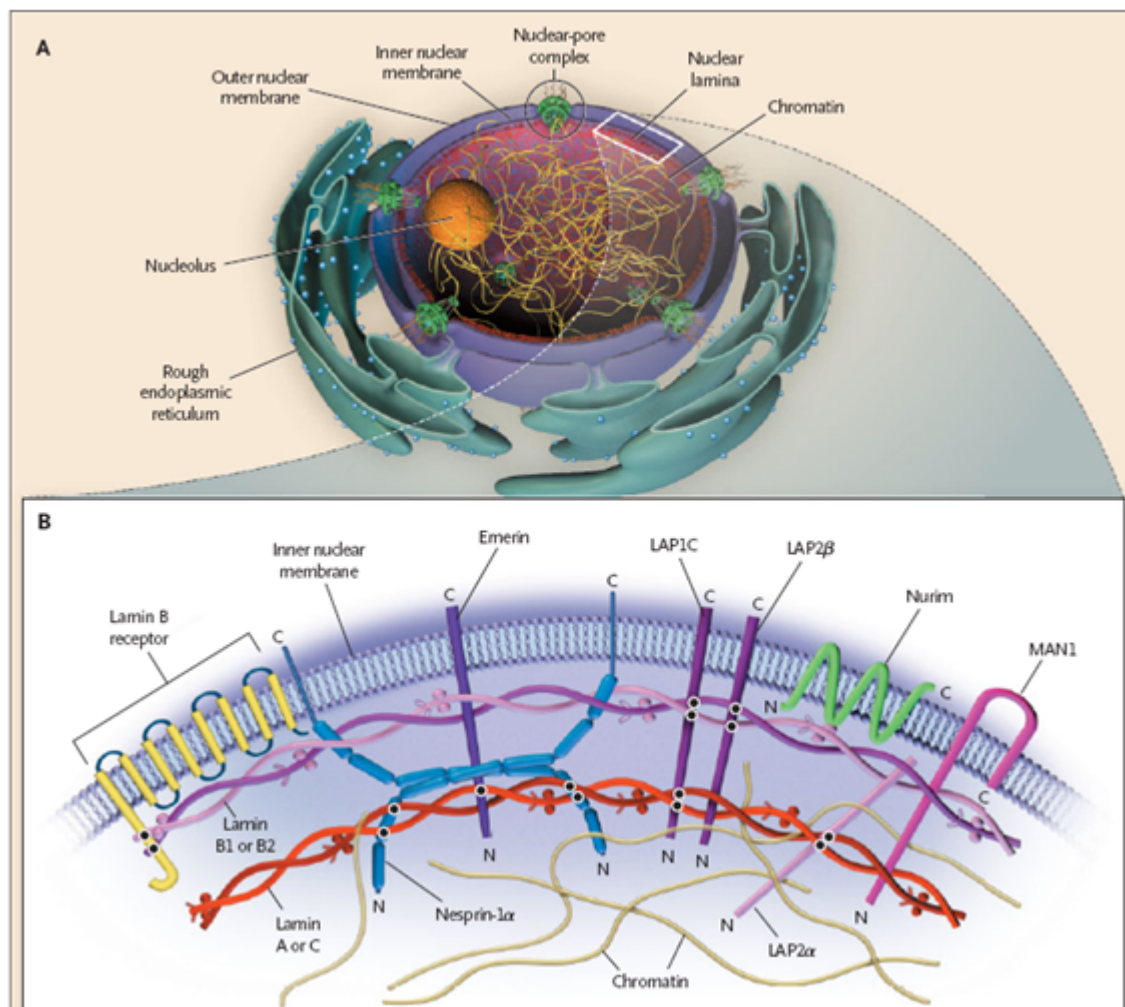


Figura 1.5: Estructuras de la envoltura nuclear (A) y sus proteínas (B). En “A” se muestra la estructura de la membrana nuclear con la lámina nuclear debajo de la membrana nuclear interna (INM). En “B” se muestra la organización de la lámina nuclear y las proteínas de la INM. Las laminas A, C, B1 y B2 forman estructuras “coiled-coil” en el dominio “rod” que median la dimerización. Emerina, nesprina-1a y el polipéptido 1C y 2a asociado a la lámina (LAP1C y LAP2a, respectivamente) interactúan con las laminas A y C, mientras que el polipéptido 2b asociado a la lámina (LAP2b), el receptor de lamina B, y LAP1C interactúan con las laminas B1 y B2. Las laminas también interactúan con la cromatina y la proteína del retinoblastoma. Una alteración de la interacción entre las laminas A y C, y otras proteínas de la envoltura nuclear podría causar la expresión tejido específica de distrofias inducidas por laminas. (Tomada de: Garg *et al.*, 2004 [151])

### 1.2.1. MEMBRANA NUCLEAR INTERNA Y LÁMINA NUCLEAR

La membrana nuclear interna (INM) está definida por un subconjunto de proteínas integrales de membrana (IMPs) denominadas proteínas transmembrana de la envoltura nuclear (NETs) que están ancladas en la INM durante la interfase [152] [153] [154]. Por debajo de la INM se



encuentra una red de filamentos intermedios específicos del núcleo, llamada lámina nuclear. Muy cerca de la INM está la cromatina periférica, de la cual una gran parte es heterocromatina. La lámina nuclear es un entramado de proteínas localizado entre la INM y la cromatina periférica en las células de animales multicelulares (Metazoos). La lámina nuclear incluye proteínas miembros de la familia de las laminas, más un creciente número de proteínas asociadas [155] [156] .

La lámina nuclear es un componente esencial de la célula en los animales multicelulares [157] y contribuye a la estabilidad mecánica de la envoltura nuclear, estando implicada en el anclaje de los complejos de poro nuclear, en la organización de la cromatina y en la replicación y transcripción del ADN. La importancia de la función de la lámina nuclear se hace especialmente notable cuando se producen alteraciones inducidas en las laminas por ARN de interferencia, así como por mutaciones en genes que codifican para laminas, las cuales causan una amplia variedad de enfermedades hereditarias en humanos llamadas laminopatías (ver sección 1.3.3) [148] [158] [159] .

### 1.2.2. COMPLEJO DE PORO NUCLEAR

Los complejos de poro nuclear (NPCs) son estructuras que fusionan las membranas INM y ONM para formar canales acuosos de translocación que permiten la libre difusión de pequeñas moléculas e iones, así como el transporte de grandes macromoléculas (>40 kDa) mediado por receptores (Figuras 1.6 y 1.7). Siendo las únicas puertas para la importación y exportación hacia y desde el núcleo, los NPCs regulan el transporte núcleo-citoplasmático de macromoléculas de forma altamente selectiva para mantener las funciones celulares [160]. Cada NPC es capaz de facilitar tanto la importación como la exportación de proteínas y ARNs [161] .

En las células animales, cada complejo tiene una masa molecular estimada de unos 125 millones de daltons y se piensa que está compuesto por más de 50 proteínas diferentes, organizadas en una prominente simetría octogonal [162].

Las proteínas que componen el NPC son llamadas nucleoporinas (Nups) y se presentan en múltiples copias [163] [164] [160] . Las Nups tienen funciones específicas en el ensamblaje y función del NPC [165] (Figura 1.6).

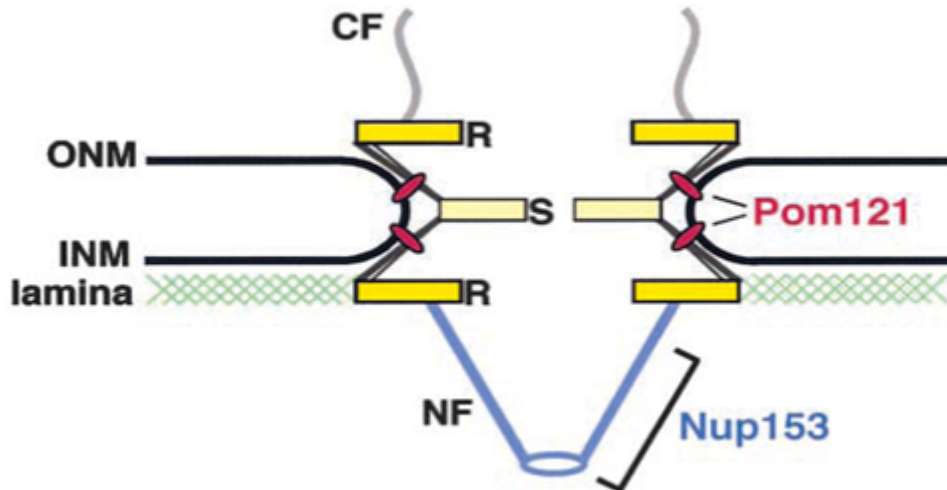


Figura 1.6: Modelo del complejo de poro nuclear (NPC). El NPC tiene lugar en regiones donde la membrana nuclear externa (ONM) y la membrana nuclear interna (INM) se continúan. La red del NPC consiste en ocho rayos centrales (S) que están conectados para flanquear los anillos (R) por donde salen los filamentos citoplasmáticos (CF) y nucleares (NF). Los NF frecuentemente están unidos en su terminación distal para formar una estructura en forma de cesto. El NPC está pegado al lado nucleoplasmático de la lámina. POM121, proteína integral de membrana localizada en la región anillo–rayos del NPC. Nup153, proteína periférica de membrana que se encuentra en los NF. (Adaptada de: Lyman and Gerace, 2001 [166])

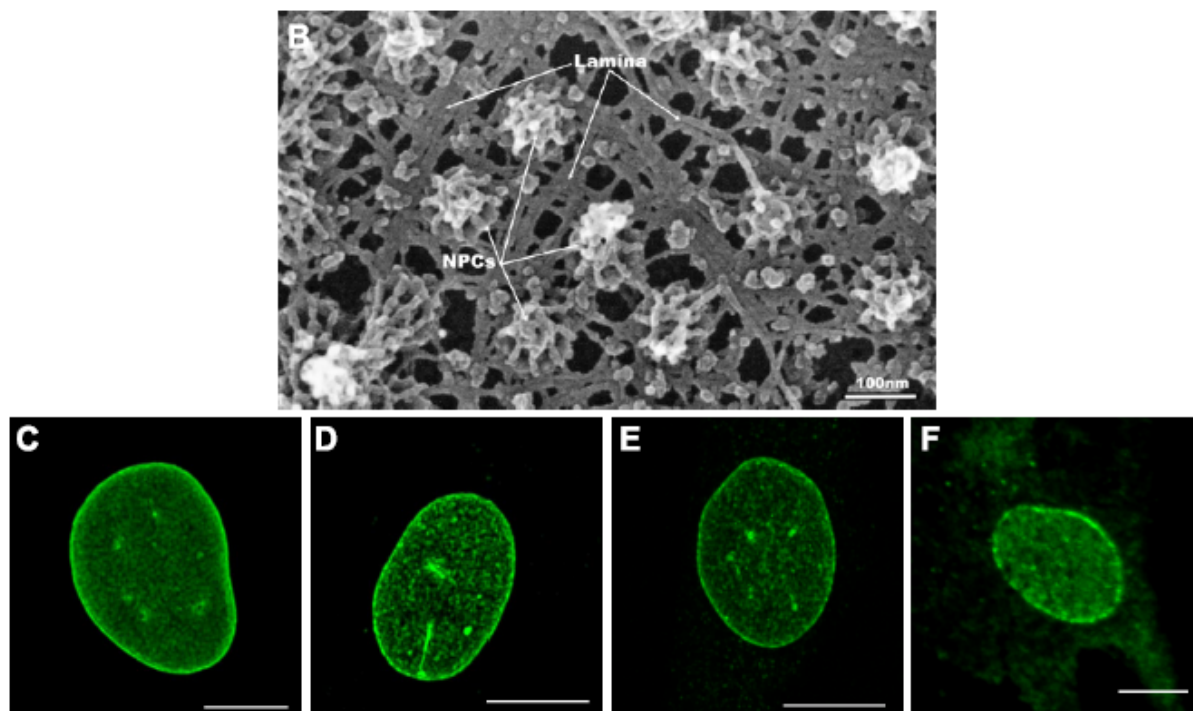


Figura 1.7: B: Examen de microscopía electrónica que muestra la organización de la lámina en envolturas de vesícula germinal (VG) de *Xenopus* oocyte. Envolturas de VG aisladas y esparcidas sobre láminas de silicona, fijadas y recubiertas. Se pueden ver los filamentos de lamina extendidos entre los complejos de poro nuclear (NPCs). C - F: Inmunofluorescencia marcando fibroblastos humanos de piel con anticuerpos para lamina A/C (C), lamina B1 (D), emerina (E), y la proteína de NPC p62 (F). Fluorescencia examinada por microscopía con focal. (Adaptada de: Broers *et al.*, 2006 [148])

### 1.2.3. PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA NUCLEAR, PROTEÍNAS ASOCIADAS Y FUNCIONES DE LAS MISMAS

#### 1.2.3.1. Proteínas integrales de membrana

Las primeras proteínas integrales de membrana (IMPs) de la INM fueron detectadas y caracterizadas por su habilidad para interactuar con las laminas o la lámina nuclear [167] [168]. Actualmente, hay descritas unas 67 supuestas proteínas transmembrana de la envoltura nuclear (NETs) en mamíferos [152], aunque la gran mayoría están pobremente caracterizadas.

Los polipéptidos asociados a la lámina (LAPs) fueron originalmente identificados a través de su asociación con fracciones de la lámina [167]. Entre los PALs, la familia LAP2 es la mejor caracterizada. Existen seis isoformas de LAP2 (LAP2 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\chi$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\phi$ ) obtenidas por cortes y empalmes alternativos, cinco de las cuales son IMPs tipo II, con un dominio COOH-terminal transmembrana común y dominios variables NH2-terminal en el nucleoplasma [169]. LAP2 $\alpha$

carece de dominio transmembrana y, en su lugar, tiene un dominio largo, específico de LAP2 $\alpha$  en el COOH-terminal. Esta proteína está localizada en el nucleoplasma, no en la membrana nuclear [170], donde se une a laminas tipo A [171].

La emerina fue originalmente identificada como una proteína de 34-kDa codificada por el gen *EMD* localizado en el cromosoma X humano, el cual cuando está mutado da lugar a la forma ligada al cromosoma X de la distrofia muscular de Emery-Dreifuss [172]. La emerina es también una IMP de tipo II con un dominio NH<sub>2</sub>-terminal nucleoplasmático [173] [174]. Esta proteína se une a todas las laminas pero muestra una unión preferente por la lamina C [175] [176], y sus patrones de expresión en vertebrados van estrechamente paralelos a la expresión de las laminas tipo A [177] .

MAN1 es una IMP con dos dominios transmembrana (expandidos) y dominios NH<sub>2</sub>- y COOH- terminal nucleoplasmáticos [178]. La función de MAN1 es importante al inicio del desarrollo, donde comparte funciones solapadas con emerina en: la unión a lamina, la segregación de los cromosomas y la división celular, que son esenciales para la supervivencia de la célula [178] .

Las proteínas de dominio “SUN”, conservadas desde las levaduras hasta los humanos, se definen por un motivo de 120 residuos localizados en el espacio luminal de la envoltura nuclear. Los mamíferos poseen cuatro genes que codifican para estas proteínas: SUN1 y SUN2, y dos genes específicos de testículo, SUN3 y Spag4 [179]. Las proteínas humanas SUN1 (hSUN1) y hSUN2 poseen un dominio “coiled-coil” cerca del dominio SUN que media la dimerización y está también involucrado en la unión con el dominio de KASH; su dominio amino-terminal expuesto al nucleoplasma se une a laminas [180] [179].

“Nesprinas” es el nombre que se da a las proteínas de dominio KASH en mamíferos. El dominio KASH comprende un dominio transmembrana carboxi-terminal único, seguido por un dominio luminal de 35 residuos. Las nesprinas fueron identificadas por primera vez en 2001 como una familia de proteínas con dominios “spectrin-repeat” que se localizan en la membrana nuclear en múltiples tejidos [181]. Estos dominios “spectrin repeat” median interacciones proteína-proteína. Las nesprinas son notables por el gran tamaño de algunas de sus variantes de corte y empalme alternativos (hasta >800 kDa). Nesprina-1 y nesprina-2 están localizadas en ambas, INM y ONM, pueden unirse a actina [181] [182], también se unen

a laminas A/C y a emerina *in vivo* e *in vitro*; su localización en la envoltura nuclear depende de la expresión de lamina tipo A [183] [184] [185] [186]. Se ha demostrado además que estas proteínas son esenciales para la migración nuclear [187].

### 1.2.3.2. Laminas

Los principales componentes de la lámina nuclear, las laminas, son miembros de la familia de proteínas del filamento intermedio tipo V [188] [189].

El peso molecular de las laminas oscila entre 60 a 70 kDa y tienen una estructura característica: un pequeño extremo N-terminal (“head domain”), un dominio “coiled-coil” de 52-nm (“rod domain”) que se divide en cuatro segmentos de  $\alpha$ -hélice, “coil” 1A, 1B, 2A y 2B, separados por secuencias conectoras no  $\alpha$ -hélice, y un extremo globular C-terminal (“tail domain”) [148] (Figura 1.8). El dominio “rod” media la dimerización de lamina, mientras que los dominios “head” y “tail” median el ensamblaje de un extremo a otro del polímero y ensamblajes de mayor grado [190]. Las laminas forman dímeros de hélice “coiled-coil” que son los sillares estructurales para posteriores ensamblajes (Figura 1.8).

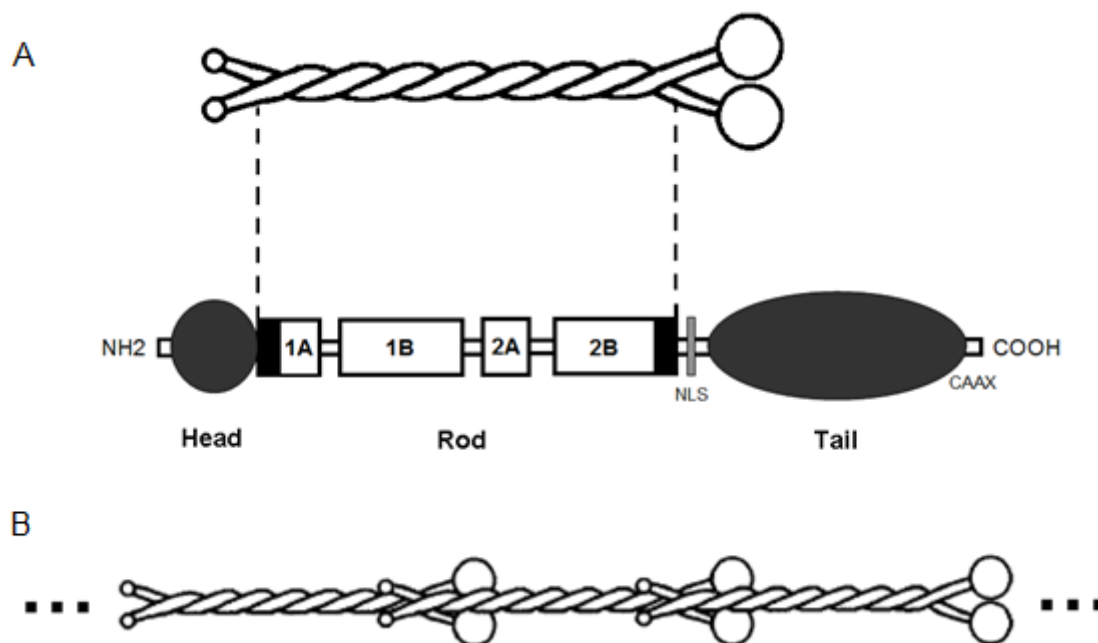


Figura 1.8: Estructura y ensamblaje de las laminas nucleares. A: Representación de los cuatro dominios “rod” (1A, B, 2A, B), flanqueados por un dominio globular “head” y un dominio globular “tail”. En el dominio “tail” se puede identificar una señal de localización nuclear (NLS), así como un motivo CaaX presente en la lamina A y en las laminas tipo B, mientras que está ausente en la lamina C. En la parte superior, se representa un dímero de lamina con estructura de  $\alpha$ -hélice “coiled-coil”, alineado con su secuencia primaria (correspondiente a los dominios “rod”). B: Modelo de ensamblaje de los dímeros por asociación “head”-“tail” para formar oligómeros de orden superior. (Modificada de: Stuurman *et al.*, 1998 [190])

El dominio globular “head” de las laminas es generalmente mucho más corto que en otras proteínas del FI, y este dominio “head” de 28-residuos en lamina A (y C) tiene una carga altamente positiva. Lo mismo sucede hacia la parte del COOH-terminal en el dominio “rod”, indicando que ambas regiones son importantes para las interacciones proteína-proteína.

Estudios de cristalografía de rayos X [191] y RMN [192] han revelado que el dominio globular COOH-terminal de las laminas (cerca de 116 de residuos) muestra una estructura *Ig-like* o plegamiento similar al de las inmunoglobulinas. Estos 116 residuos están plegados en un “ $\beta$ -sandwich” de nueve cadenas  $\beta$  (Figura 1.9). El centro de este dominio globular está formado por residuos hidrofóbicos, mientras que la mayoría de los residuos con carga están en la superficie de la molécula [192], permitiendo interacciones con otras proteínas (no laminas) o ADN [193]. Entre la parte COOH-terminal del dominio “rod” y el dominio “Ig-like”, las laminas contienen una secuencia denominada señal de localización nuclear, que no está presente en otras proteínas del FI [194]. Se ha visto que mutaciones en la señal de localización nuclear conducen a un ensamblaje aberrante de las laminas en el citoplasma [195].

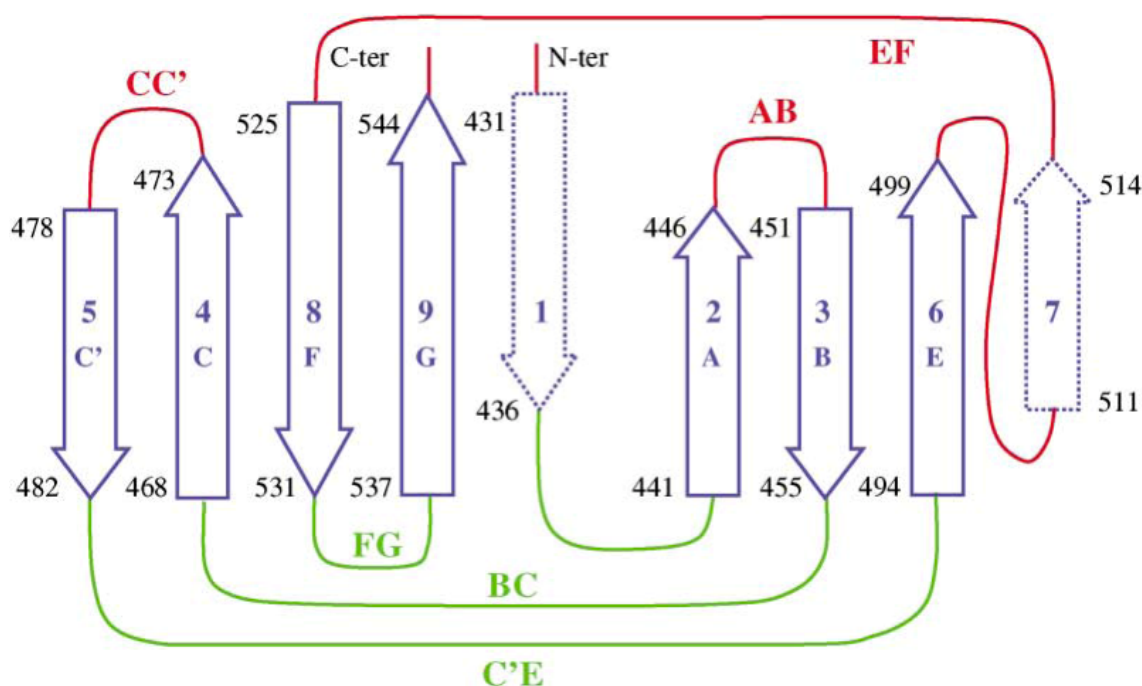


Figura 1.9: Topología del dominio C-terminal de la Lamina A/C. Las cadenas pertenecientes a dos láminas beta se muestran como flechas azules. Sus límites (número de aminoácido) se indican al lado de los extremos de las flechas. Las flechas azules corresponden a las cadenas que forman el clásico plegamiento Ig de tipo “s”, mientras que las flechas de puntos discontinuos representan las cadenas  $\beta$  características del plegamiento de la lamina. Los lazos localizados en el lado N-terminal del *sandwich*  $\beta$  se muestran en color rojo y los lazos localizados en el lado opuesto aparecen en color verde. (Tomada de: Krimm *et al.*, 2002 [192])

El número de polipéptidos de lamina varía entre los diferentes organismos del reino animal [195]. Los humanos tienen tres genes de lamina distintos que codifican para siete proteínas diferentes.

La lamina B1 es aparentemente el único producto de un gen de 11 exones, *LMNB1*, localizado en el cromosoma 5q23.3-q31.1 [196]. El gen *LMNB2*, localizado en el cromosoma 19p13.3 [197], codifica para dos productos de corte y empalme alternativo: lamina B2, que se expresa en la mayoría de las células [198], y lamina B3, que se expresa sólo en espermatoцитos [199].

Las laminas tipo A (A, C, A<sub>Δ10</sub> y C2) son todas productos de corte y empalme alternativos de un único gen de 12 exones localizado en el cromosoma 1q21.1–21.3, llamado *LMNA* [200] [201]. Las laminas A y C son los principales productos de *LMNA* en la mayoría de las células diferenciadas [188] [189]. La lamina C es idéntica a la lamina A hasta el codón 566, a partir de aquí carece de parte del exón 10, así como de los exones 11 y 12; en cambio posee cinco residuos de aminoácidos básicos diferentes, en su COOH terminal. La lamina A posee un dominio “tail” específico, del aminoácido 567 al 664, que incluye un motivo estructural CaaX en el COOH-terminal [188] [189]. Todas las laminas, excepto la lamina C, poseen el motivo estructural CaaX (Figura 1.10) que contiene una cisteína, dos aminoácidos alifáticos y un aminoácido cualquiera COOH-terminal en el carboxilo terminal. Este motivo estructural es la secuencia diana para una serie de modificaciones que conducen a la isoprenilación y metilación del residuo cisteína en el COOH-terminal [202] [202] [203].

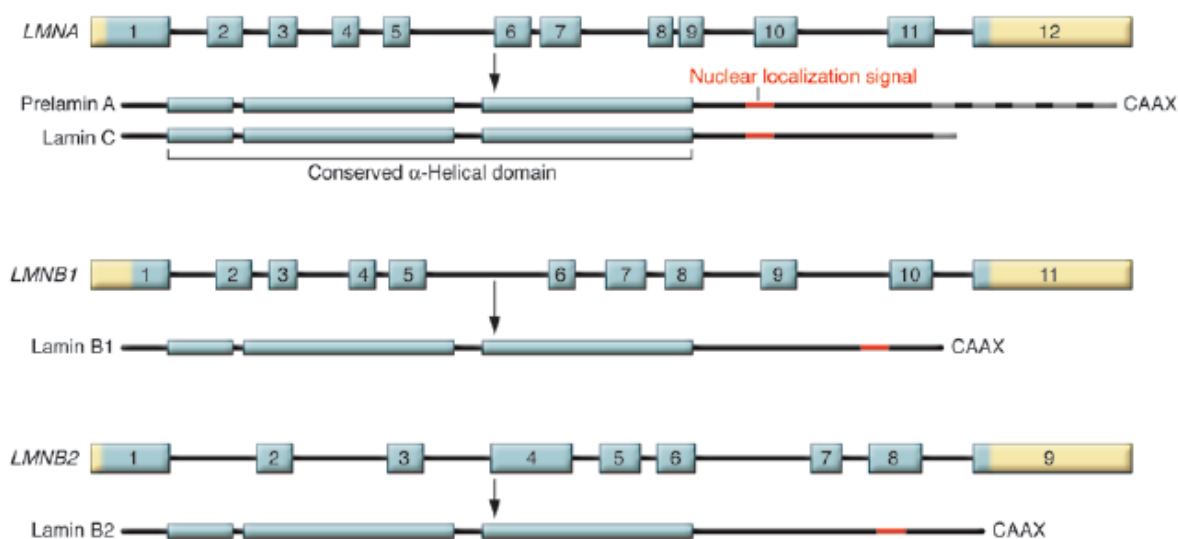


Figura 1.10: En humanos, 3 genes codifican para laminas nucleares. *LMNA*, localizado en el cromosoma 1q21.2, codifica para las laminas tipo A, se genera prelamina A y lamina C por *splicing* alternativo del ARN (como principales isoformas de este gen en las células somáticas). La prelamina A posee 98 aminoácidos exclusivos y la lamina C 6 aminoácidos exclusivos en su carboxilo terminal (indicados en gris). *LMNB1* en el cromosoma 5q23.3–q31.1, codifica para lamina B1, y *LMNB2*, en el cromosoma 19p13.3, codifica para lamina B2, las laminas tipo B de las células somáticas. Todas las laminas poseen dominios “rod” α-helice conservados y dominios “head” y “tail” variables. La señal de localización nuclear está siempre localizada en el dominio “tail” (indicada en rojo). Prelamina A, lamina B1, y lamina B2 poseen motivos CaaX carboxi-terminal, una señal para la farnesilación de la proteína. (Tomada de: Worman *et al.*, 2009 [204])

Tanto la isoprenilación como la metilación de los residuos de cisteína COOH-terminal son necesarios para la localización de las laminas tipo A y B en la INM. Aunque, una vez en la INM los destinos de estos dos tipos de laminas son diferentes. La lamina tipo B permanece isoprenilada, mientras que la lamina tipo A es procesada desde la forma llamada prelamina A hasta la lamina madura.

#### 1.2.3.2.A. Procesamiento de la prelamina A

El precursor de la lamina A, la prelamina A, experimenta cuatro pasos de procesamiento sobre el motivo estructural CaaX en su extremo COOH-terminal (CSIM) [205] [206] (Figura 1.11): Primero, se produce la adición de un isoprenoide carbono 15-farnesilado al grupo tiol de la cisteína por la enzima citosólica proteinfarnesiltransferasa. Segundo, los tres últimos aminoácidos de la proteína son eliminados (-aaX) por la endoproteasa ZMPSTE24 (también llamada FACE1) o por RCE1, o por ambas [207] [208]; no se ha establecido cuál de estas enzimas juega el papel predominante en el procesamiento de prelamina A. Tercero, la cisteína farnesilada es carboxil-metilada [209] [210] por la enzima ICMT. Entonces, la prelamina A es



trasladada a la INM donde, cuarto y último paso, ZMPSTE24 escinde los 15 últimos aminoácidos de la proteína, que incluyen al éster metil farnesilcisteína, liberando la lamina A madura [211] [207].

La maquinaria enzimática para transformar prelamina A en lamina A madura es tan eficiente que la prelamina A es virtualmente indetectable en células *wild type*. Sin embargo, todo el procesamiento puede ser bloqueado con un inhibidor de la enzima proteinfarnesiltransferasa (FTI) [212]. En ausencia de farnesilación no se produce ninguno de los subsiguientes pasos del procesamiento, y la prelamina A no farnesilada se acumula en las células [207] [212].

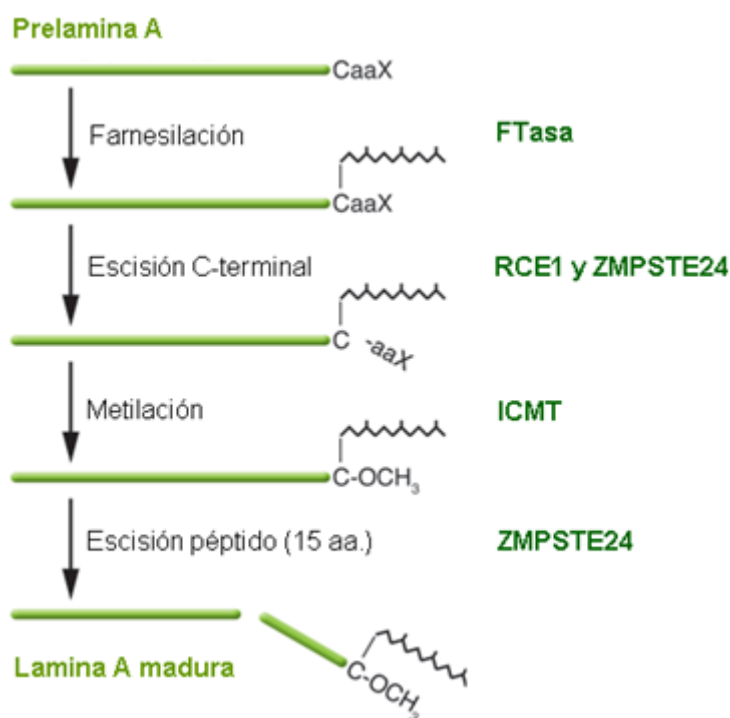


Figura 1.11: Representación esquemática del procesamiento post-traduccion de la prelamina A. Cuatro pasos secuenciales de procesamiento post-traduccion: Primero, la cisteína del motivo CaaX en el carboxilo-terminal (C-terminal) es farnesilada por la enzima farnesil-transferasa (FTasa). Segundo, los tres últimos aminoácidos (-aaX) son eliminados por dos endoproteasas (en una aparente actividad redundante de RCE1 y ZMPSTE24) del retículo endoplásmático, específicas de proteínas preniladas. Tercero, el nuevo C-terminal farnesilcisteína expuesto es metilado por isoprenilcisteína carboxilo-metiltransferasa (ICMT). Y cuarto, los 15 últimos aminoácidos del C-terminal, incluyendo el éster metil farnesilcisteína, son eliminados por ZMPSTE24, generando la lamina A madura. (Modificada de: Worman *et al.*, 2009 [204]).

#### 1.2.3.2.B. Interacciones y funciones de las laminas

La mayoría de las proteínas de INM caracterizadas se pueden unir directamente a las laminas tipo A o B, o a ambas (Figuras 1.12 y 1.13). Las laminas tipo A y B polimerizan para formar

complejos separados de filamentos intermedios nucleares que se concentran cerca de la INM en Metazoos [213]. Muchas proteínas de la INM mantienen su localización por unión directa o indirecta a filamentos de lamina. Las laminas tipo B son esenciales para la viabilidad y desarrollo de la célula, mientras que las laminas tipo A surgieron más tarde en la evolución y se ha visto que no son esenciales [214]. Los filamentos de lamina son importantes para el ensamblaje, la estructura, forma y estabilidad mecánica del núcleo en los Metazoos.

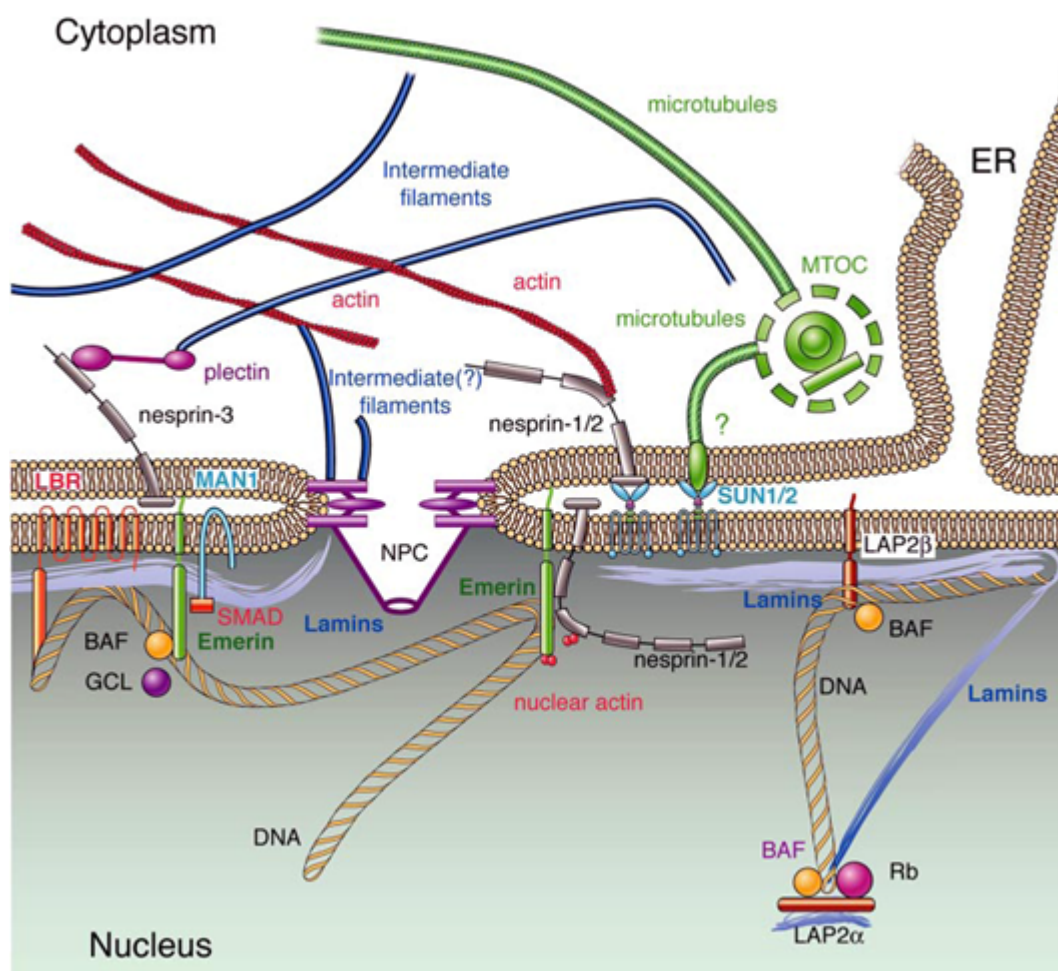


Figura 1.12: Modelo de localización de las laminas nucleares y las interacciones con proteínas localizadas en su vecindad. Las laminas se unen directamente a las proteínas asociadas a la lámina (LBR, LAP2, emerina, MAN1, nesprinas-1 y 2), pero también a BAF, Rb, SREBP1, histonas y ADN; así median la asociación con una serie de proteínas estructurales que interactúan, como SUN1, actina, y posiblemente tubulina y proteínas del filamento intermedio. Los signos de interrogación indican las interacciones que se sugieren pero que aún no han sido probadas. (Tomada de: Broers *et al.*, 2006 [148]).

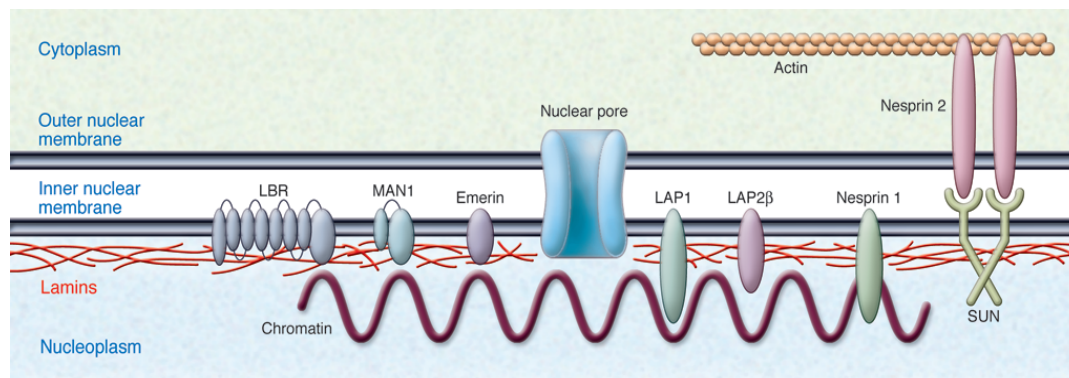


Figura 1.13: La lámina nuclear (representada esquemáticamente en rojo) es un entramado de filamentos intermedios localizados principalmente en la cara nucleoplasmática de la membrana nuclear interna (INM). Las laminas interactúan con numerosas proteínas integrales de la INM, incluyendo el receptor de lamina B (LBR), MAN1, emerina, LAP, LAP2 $\beta$ , pequeñas isoformas de nesprina 1, y SUNs. Las SUNs interactúan con las grandes isoformas de nesprina 2. Proteínas integrales de la membrana nuclear externa, que también interactúan con actina, conectan la lámina nuclear con el citoesqueleto. (Tomada de: Worman *et al.*, 2009 [204])

Se ha descrito que en *C. elegans* se produce una unión de laminas con microtúbulos y MTOC (centrosoma), al parecer, mediada por las proteínas UNC-84 y UNC-83 [215]. También en *Drosophila* se demostró una conexión de las laminas con los microtúbulos mediante la proteína Klarsicht [216]. Aunque, hasta la fecha, no se han descrito proteínas homólogas a éstas en vertebrados, los datos obtenidos a partir de *C. elegans* y *Drosophila* sugieren una estrecha unión de MTOC y los microtúbulos al núcleo vía laminas [217].

La lámina nuclear y el citoesqueleto forman una estructura integrada que garantiza el funcionamiento correcto de las células. Se ha visto que la ausencia de laminas tipo A afecta a la organización y función de los diferentes elementos del andamio citoesquelético del núcleo. Especialmente, se ve alterado el acoplamiento nuclear de microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios, y las proteínas nucleares asociadas a membrana se dislocan hacia el retículo endoplasmático. Houben y colaboradores demostraron que en fibroblastos de ratón *Lmna*  $-/-$  o con el gen *Lmna* silenciado estas anomalías estructurales están asociadas con alteraciones en la motilidad del núcleo y la migración celular durante la cicatrización *in vitro* [218].

Las laminas, como principales proteínas estructurales de la INM, tienen importantes funciones de anclaje para las proteínas transmembrana de la envoltura nuclear (NETs). Los complejos laminas/NETs intervienen en la organización de la cromatina periférica. En vertebrados, se han estudiado las asociaciones de las laminas con NETs usando células de ratones *knockdown* por ARN de interferencia o utilizando mutantes dominantes negativos que afectan a los

filamentos de las laminas. Se ha visto que existen distintos complejos lamina tipo A o tipo B con NETs [148]. Tanto para las laminas como para las NETs, se han descrito funciones en la replicación y transcripción del ADN; sin embargo, su papel exacto es difícil de definir debido a la naturaleza compleja de estos procesos. Se sugiere que algunas de esas funciones en la transcripción se producen en la INM e involucran la formación de complejos represores [148].

Actualmente son crecientes las evidencias de que las laminas regulan la organización de la cromatina y la expresión génica, y que influyen en la señalización [213] [217]. En estas funciones está involucrado un espectro de interacciones bioquímicas entre laminas, cromatina, y una variedad de parejas de unión, incluyendo proteínas reguladoras que responden a señales externas e internas. Se sabe que algunas proteínas se unen a las laminas de modo directo y relativamente estable en la envoltura nuclear o en el interior del núcleo. Mientras que otras proteínas se unen a las laminas de modo más transitorio, probablemente como un medio de regulación de sus actividades. Estas parejas de unión incluyen a PCNA, c-Fos, retinoblastoma (Rb) y Oct-1 [214].

Las proteínas LAP2, emerina y MAN1 constituyen una prominente familia de proteínas de unión a lamina involucradas en la arquitectura nuclear y organización de la cromatina, que comparten un dominio de aproximadamente 45 residuos llamado dominio LEM [219]. Las proteínas estudiadas que comparten este dominio se unen no sólo a las laminas sino también a la pequeña proteína dimérica “barrier to autointegration factor” (BAF) [220] [217] [221].

BAF es una proteína de 10-kDa, conservada, móvil, de unión a lamina y al ADN de doble cadena, y que interactúa con histonas [222] [223]. BAF se localiza en el nucleoplasma, citoplasma y membrana. Su distribución intracelular varía de acuerdo al ciclo celular, con localización nuclear durante la progresión de la fase “S” [222] [221] [224]. La regulación de BAF depende de su estado de modificación y de las parejas de unión en el núcleo y membrana nuclear [222] [225] [226].

Se ha descrito además que BAF se une a la prelamina A *in vitro* [225]. Recientemente, Capanni y colaboradores demostraron que la localización heterogénea de BAF entre el núcleo y el citoplasma, observada en células HEK293 durante su ciclo celular cambia en respuesta a la acumulación de prelamina A. Estos autores observaron que la acumulación de lamina A, prelamina A no-farnesilada y prelamina A farnesil-carboximetilada inducen la traslocación nuclear de BAF. Además, observaron que la acumulación de progerina, forma truncada de prelamina A farnesilada y carboximetilada, identificada a nivel celular en el síndrome

progeroide de Hutchinson-Gilford, induce un reclutamiento de BAF en el núcleo. Sugieren entonces que BAF podría mediar los efectos que induce la prelamina A en la cromatina [227].

En otro estudio muy reciente se describe un síndrome progeroide con un fenotipo parcial de HGPS, asociado a una mutación homocigótica en el gen *BANF1* (c.34G>A ,p.Ala12Thr) que codifica para BAF [228]. El estudio funcional mostró que fibroblastos de los pacientes portadores de dicha mutación presentan una drástica disminución en los niveles de la proteína BAF. Además, estos fibroblastos progeroides presentan importantes anormalidades en la lámina nuclear que incluyen protuberancias y distribución anormal de emerina, una proteína que interacciona con BAF. Estas alteraciones nucleares se vieron corregidas por expresión ectópica de *BANF1 wild type*, demostrándose el papel causal de la mutación.

Todas las proteínas LEM estudiadas se unen a la lamina tipo A o B, o a ambas, directamente; algunas requieren de esta interacción para establecerse en la membrana nuclear. A su vez, las laminas también se unen directamente con el ADN y las histonas. Por lo que en el anclaje de la cromatina a la envoltura nuclear y a las laminas, está involucrada una red compleja de interacciones entre laminas, proteínas LEM, BAF y, lo más probable, otras proteínas de la INM [214].

Algunos estudios *in vitro* han mostrado la interacción de las laminas con otras estructuras intranucleares, que incluye la asociación (temporal) con la cromatina o la unión a las histonas [155] [229]. Además, ha sido localizado un sitio de unión a la cromatina en el dominio “tail” de las laminas A y C de mamíferos [229].

Se cree que las laminas tienen una función en la organización de orden superior de la cromatina, actuando como parte de un andamio molecular con las proteínas integrales de membrana para mantener unida la cromatina periférica y los complejos de remodelación de la cromatina, a la envoltura nuclear [217] [230].

La función de la lamina A/C en la organización de la cromatina se ha hecho evidente en estudios que muestran como mutaciones en el gen *LMNA* humano conducen a envejecimiento prematuro y pérdida progresiva de la heterocromatina [231] [232]. Los datos disponibles hasta la fecha sugieren un papel para la lámina nuclear en el mantenimiento de la heterocromatina y el silenciamiento de genes.

La membrana plasmática contiene muchos complejos estructurales que son regulados dinámicamente y generan señales a las que la célula da una respuesta específica de tejido, en muchos casos a nivel de regulación génica. Existe una evidencia creciente de que este paradigma podría aplicarse también a los complejos de proteínas asociados a laminas en la envoltura nuclear y en el nucleoplasma. El concepto de una señalización dinámica asociada a lamina se basa en estudios sobre un gran número de proteínas con dominio LEM. Por ejemplo, LAP2 $\beta$ , la mayor isoforma de LAP2 localizada en la INM, se une a la lamina B específicamente, y también interactúa directamente con reguladores transcripcionales [214].

Las laminas tipo A parecen influir en la actividad de proteínas que regulan la transcripción. Se ha descrito que estas laminas se unen a cuatro reguladores de la transcripción diferentes llamados: “Kruppel-like protein” MOK2 [226], “sterol response element binding protein” SREBP1 [233], la “pocket protein” proteína del retinoblastoma (Rb) [234], y tienen una interacción directa con c-Fos [235]. La proteína Rb ha sido localizada unida a filamentos del núcleoesqueleto que tienen dimensiones similares a las de los filamentos intermedios [236], existiendo evidencias de que estos filamentos contienen laminas tipo A [171] [237].

Además, se ha demostrado que una alteración en la organización normal de las laminas inhibe la actividad de ARN polimerasa II [238]. Este hallazgo sugiere que las laminas están involucradas en la síntesis de ARN al actuar como un andamio sobre el cual se organizan los factores de transcripción necesarios para la activación de la ARN polimerasa II.

Otras funciones parecen producirse dentro del nucleoplasma y suponen que las laminas, particularmente las laminas tipo A, están confinadas en cuerpos nucleares, donde deben interactuar con parejas de unión que no son IMPs. Estudios recientes han revelado que las laminas tipo A tienen importantes funciones regulando la diferenciación de células madre adultas y que éstas funciones fallan cuando la lamina A está mutada [148].

En 2005, Capanni y colaboradores demostraron que la prelamina A representa una pareja de unión de SREBP1 a la envoltura nuclear. Estos autores encontraron que la prelamina A, aunque no la lamina A, se unía a SREBP1 en la envoltura nuclear de fibroblastos de pacientes lipodistróficos o en fibroblastos controles en los que se indujo acumulación de prelamina A usando inhibidores de la farnesilación [239].

Se sabe que la diferenciación adipogénica de la célula está asociada con la regulación negativa de la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina. En 2009, Tilgner y colaboradores, usando

preadipocitos y fibroblastos de piel, encontraron que la activación del programa adipogénico estaba asociada con notables cambios en la expresión de las proteínas nucleares de interacción con  $\beta$ -catenina, emerina y laminas A/C, que influyen en la expresión y activación de PPAR $\gamma$  [240].

### 1.3. LIPODISTROFIAS

Las lipodistrofias son un grupo de desórdenes clínicos caracterizados por lipoatrofia o pérdida selectiva de tejido adiposo de regiones anatómicas concretas, que van desde las formas localizadas a las generalizadas [151]. El alcance que tenga la pérdida de tejido adiposo suele determinar la severidad de las manifestaciones clínicas y metabólicas [241].

Las lipodistrofias pueden ser clasificadas de modo general en dos tipos: genéticas (familiares) y adquiridas. Las lipodistrofias suelen estar asociadas con resistencia a la insulina, uno de los trastornos principales en la patogenia de la diabetes mellitus tipo 2 [242] y que con frecuencia está presente en la obesidad común [243]. Se considera, por tanto, a las lipodistrofias familiares como modelos monogénicos de resistencia a la insulina.

#### 1.3.1. LIPODISTROFIAS ADQUIRIDAS

Existe un grupo de lipodistrofias en las que no se reconoce un patrón mendeliano de herencia ni una base familiar, tampoco se han identificado mutaciones responsables de estos trastornos, son las denominadas lipodistrofias adquiridas. Éstas incluyen el síndrome de Lawrence o lipodistrofia generalizada adquirida, el Síndrome de Barraquer-Simons o lipodistrofia parcial adquirida, la lipodistrofia asociada al tratamiento del SIDA y otras (Tabla 1.1) [244].

Tabla 1.1 Lipodistrofias adquiridas. (Adaptada de: Garg, Misra 2004 [244]).

---

1. Lipodistrofia Generalizada Adquirida (AGL) o síndrome de Lawrence
• Tipo 1: variedad paniculitis
• Tipo 2: variedad enfermedad autoinmune
• Tipo 3: variedad idiopática
2. Lipodistrofia Parcial Adquirida (APL) o síndrome de Barraquer-Simons
3. Lipodistrofia en pacientes infectados con el VIH
4. Lipodistrofias localizadas

---

#### 1.3.1.1. Lipodistrofia Generalizada Adquirida (Síndrome de Lawrence)

Este trastorno, descrito inicialmente por Ziegler y Lawrence [245] [246], se caracteriza por una desaparición del tejido adiposo en todo el cuerpo, diabetes mellitus no cetósica, hipertrigliceridemia y hepatomegalia. A diferencia de la lipodistrofia generalizada de Berardinelli-Seipin (sección 1.3.2.1.A), no se manifiesta desde el nacimiento sino después de la primera infancia o adolescencia (Figuras 1.14 y 1.15).

Es una enfermedad rara que afecta más frecuentemente a mujeres que a hombres. La pérdida de grasa tiene lugar en todo el cuerpo, incluyendo característicamente la palma de las manos y la planta de los pies; sin embargo, se preserva la grasa de la médula ósea y la región retro-orbital [247]. La pérdida de tejido adiposo suele ser gradual y lenta, iniciándose en una parte determinada antes de generalizarse a lo largo de meses o años, aunque a veces el proceso apenas dura unas semanas. En ocasiones la presencia de hinchazón subcutánea nodular precede el comienzo de la lipodistrofia. También es frecuente que en las descripciones de esta enfermedad se incluya la musculatura excesiva. Además de la afectación del tejido adiposo, como ya se ha comentado, es frecuente la hipertrigliceridemia grave, que en ocasiones es responsable de episodios de pancreatitis y de la presencia de xantomas eruptivos [248]. Otras alteraciones metabólicas son la diabetes mellitus, el descenso del colesterol HDL, la resistencia a la insulina, la hiperinsulinemia y la hipoleptinemia [249]. También se ha descrito acantosis nigricans e hirsutismo. La capacidad reproductiva está conservada. La hepatomegalia, en ocasiones asociada con cirrosis, es consecuencia del depósito de triglicéridos. En algún paciente se ha descrito la lipidosis tubular renal y esclerosis glomerular focal [248].

Aunque se ha descrito que este trastorno aparece después de infecciones como varicela, sarampión, hepatitis, difteria, neumonía, osteomielitis, parotiditis y mononucleosis infecciosa, en la actualidad no se cree que estas infecciones sean las responsables de la enfermedad.



La presencia, en ocasiones, de paniculitis con infiltrados de linfocitos y de macrófagos, la asociación clínica o serológica con enfermedades autoinmunes como la tiroiditis de Hashimoto, la artritis reumatoide, el vitíligo, la anemia perniciosa y la hepatitis autoinmune, así como la identificación de anticuerpos contra la membrana del adipocito, llevan a concluir que la lipodistrofia generalizada adquirida es una enfermedad autoinmune [250].



Figura 1.14: Niña de 8 años de edad, raza blanca, con lipodistrofia generalizada adquirida. Muestra notable ausencia de grasa subcutánea en extremidades y tronco, con prominentes venas y musculatura. El inicio de la lipodistrofia se produjo a la edad de 6 años La paciente presentaba diabetes mellitus e hipertrigliceridemia, pero no acantosis nigricans. (Tomada de: Garg, 2000 [251])

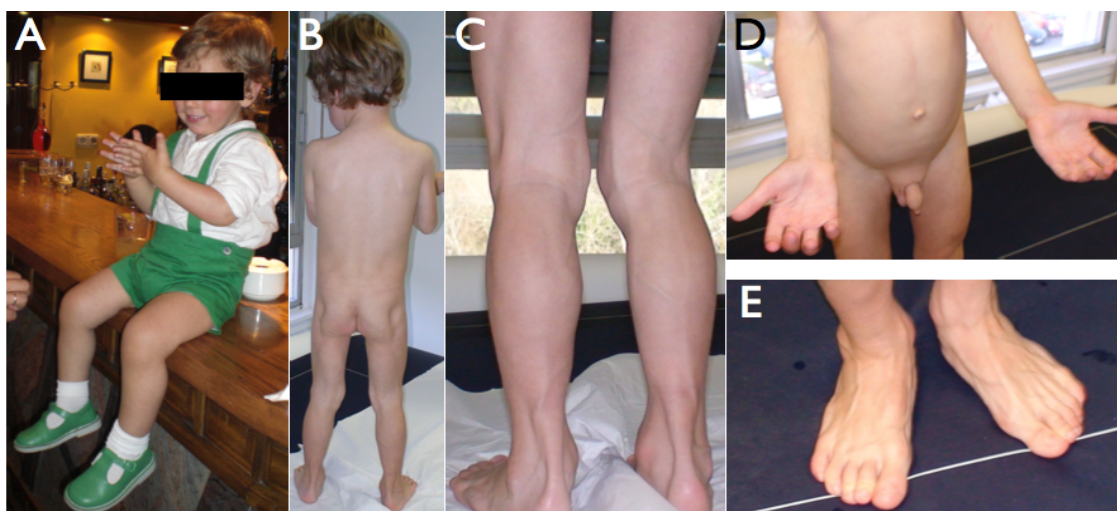


Figura 1.15: Lipodistrofia generalizada adquirida en un niño de 3 años y medio. A: A los 3 años, un mes antes de iniciar el proceso de pérdida de tejido adiposo. B: La pérdida de tejido adiposo afectó a todo el cuerpo con la excepción de la cara, y se inició 2 semanas después de recibir la vacuna de la varicela. La generalización de la pérdida de grasa puede tardar años o tener lugar en pocas semanas. C: La pérdida de grasa subcutánea pone de manifiesto el árbol venoso (flebomegalia). D y E: Los territorios afectados incluyen, característicamente en este cuadro, las palmas y las plantas. (Cortesía del Prof. Araújo-Vilar, Facultad de Medicina de Santiago de Compostela)

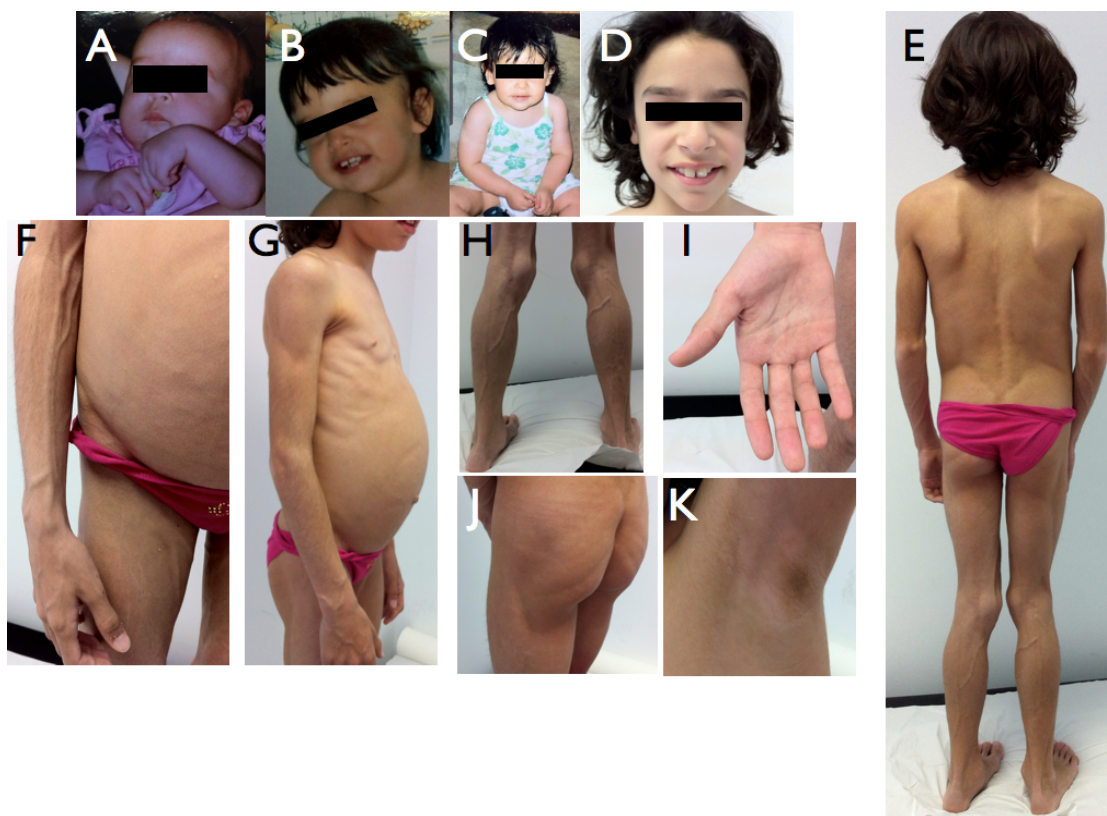


Figura 1.16: Síndrome de Lawrence en una niña de 7 años (D-K). Distribución normal de la grasa hasta los 3 años (A,B,C). Desde esa edad presenta pérdida progresiva del tejido adiposo comenzando por las extremidades inferiores, nalgas y afectando finalmente al tronco y extremidades superiores (E-J). En los últimos meses se aprecia pérdida de grasa en cara (D). Flebotomegalia evidente (F, H), acantosis nigricans (K), hepatomegalia (G), clitoromegalia y ausencia de grasa en palmas y plantas (I). Presenta hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia, hipoleptinemia y esteato-hepatitis no alcohólica. Hasta la fecha el metabolismo hidrocarbonado es normal. (Cortesía del Prof. Araújo-Vilar, Facultad de Medicina de Santiago de Compostela)

#### 1.3.1.2. Lipodistrofia Parcial Adquirida (Síndrome de Barraquer-Simons)

La lipodistrofia parcial adquirida (APL) o síndrome de Barraquer-Simons, (MIM 608709), fue descrita por primera vez hace más 100 años [252] [253] [254]. Aunque inicialmente este síndrome se incluye entre las formas adquiridas de lipodistrofia, hace unos años se han descrito mutaciones en el gen *LMNB1* asociadas a este trastorno [255]. Este síndrome está relacionado con un amplio rango de factores y condiciones secundarias, como pueden ser algunos tipos de enfermedades autoinmunes [256].

Como en algunas otras lipodistrofias, existe una mayor prevalencia de APL en las mujeres [256]. Los individuos afectados presentan una pérdida de tejido adiposo principalmente en la cara, cuello, brazos, tórax y la parte superior del abdomen, comenzando en la niñez o la adolescencia, aunque se han descrito casos en edades más avanzadas. Los depósitos de grasa de las regiones glútea y extremidades inferiores tienden a preservarse o a aumentar,

particularmente en las mujeres (Figura 1.17). La pérdida de grasa se produce a lo largo de unos 18 meses, aunque puede ocurrir periódicamente durante varios años (Figura 1.18).

A diferencia de lo observado en otros tipos de lipodistrofias, APL raramente (10% de los casos) se asocia con resistencia a la insulina, dislipemia, diabetes mellitus, acantosis nigricans o trastornos menstruales. La aparición de complicaciones metabólicas es más frecuentes en las mujeres. Los niveles de leptina y adiponectina en plasma son ligeramente bajos.

Un rasgo característico es su asociación con la glomerulonefritis membrano-proliferativa, que afecta aproximadamente a un tercio de estos pacientes. Estos enfermos no suelen presentar evidencias clínicas de enfermedad renal ni anomalías en la función renal hasta 10 años después de iniciarse la pérdida de tejido adiposo. En estos pacientes se encuentran bajos niveles de complemento C3 y se detecta la presencia del factor nefrítico C3 [257]. También se han descrito asociaciones con enfermedades autoinmunes como el hipotiroidismo, la anemia perniciosa, la dermatomiositis, la artritis reumatoide, la enfermedad celíaca, la arteritis de la temporal, la dermatitis herpetiforme, el lupus eritematoso sistémico y la vasculitis leucocitoclástica [258] [259].

En varios pacientes se han detectado anticuerpos antinucleares y anti-ADN [251]. La morbi-mortalidad de este trastorno está fundamentalmente relacionada con la afectación renal y con las enfermedades autoinmunes a las que con frecuencia se asocia. Aunque es infrecuente, la resistencia a la insulina incrementaría el riesgo cardiovascular.

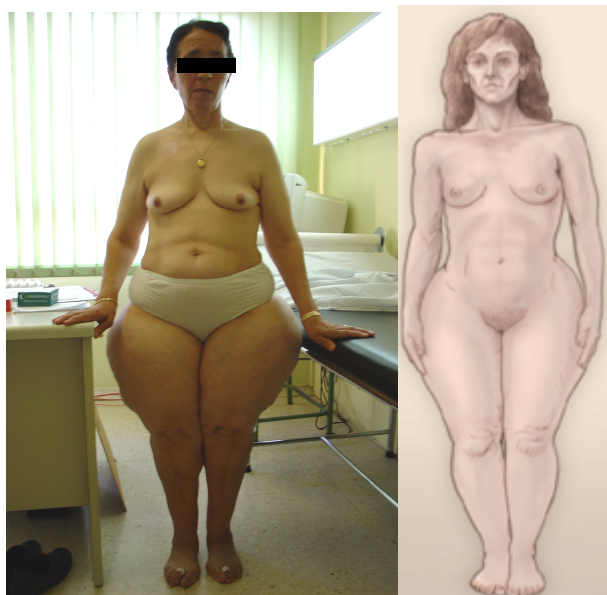


Figura 1.17: Mujer adulta con síndrome de Barraquer-Simons. Se observa una ligera pérdida del TAsc en la cara, cuello y tórax; mientras que presenta un notable acúmulo de grasa en caderas y extremidades inferiores. (Cortesía del Prof. J Lado-Abeal)



Figura 1.18: Síndrome de Barraquer-Simons en una niña de 10 años. El proceso comienza a los 6 años y medio, unas semanas después de sufrir una neumonía bacteriana, y, hasta la fecha, sólo ha afectado a la cara y el cuello. No presenta alteraciones lipídicas ni del metabolismo de la glucosa y los niveles de complemento C3 fueron bajos, aunque el factor nefrítico fue negativo. (Cortesía del Prof. Araújo-Vilar, Facultad de Medicina de Santiago de Compostela)

### 1.3.1.3. Lipodistrofia adquirida relacionada con la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana

En la clínica, la forma de lipodistrofia más frecuente es la lipodistrofia en pacientes infectados con el VIH [260], que afecta a mujeres y hombres por igual, y ha sido relacionada con la terapia anti-retroviral de gran actividad (TARGA). Entre los individuos infectados con VIH sometidos a tratamiento con TARGA es común la redistribución de la grasa corporal, afectando hasta el 50% de los individuos, aunque no existe una definición estándar o criterios clínicos bien definidos para este diagnóstico [260]. Comúnmente, presentan lipoatrofia periférica, afectando a la cara (Figura 1.19) y extremidades, y lipohipertrofia central, afectando a las regiones dorsocervical (Figura 1.20) y troncular; aunque también la lipoatrofia periférica puede presentarse asociada a lipoatrofia central [261]. Otras manifestaciones metabólicas de la lipodistrofia asociada al VIH incluye hipertrigliceridemia, niveles reducidos de colesterol HDL en plasma, resistencia a la insulina, diabetes, deficiencia de andrógenos y esteatosis hepática [262] [263] [264]. A diferencia de otros tipos de lipodistrofias, los niveles de leptina en plasma tienden a ser normales o incluso más altos, junto a niveles bajos de adiponectina [265] [266].

Los factores de riesgo para desarrollar este tipo de lipodistrofia son la edad, el sexo femenino, hipertrigliceridemia, bajo conteo de CD4 y el estadio avanzado de la infección. No obstante, el desarrollo de este síndrome lipodistrófico está claramente influenciado por el tipo de terapia anti-retroviral y la duración del tratamiento. Los nucleósidos inhibidores de la transcriptasa reversa (NRTI) están fuertemente asociados con la pérdida de grasa subcutánea, la hiperlactatemia y acidosis láctica; mientras que los inhibidores de las proteasas (PI) están más asociados con la lipohipertrofia, la resistencia a la insulina y los trastornos del metabolismo lipídico. Los efectos de los NRTI parecen estar aumentados cuando se asocian con PI. Estas combinaciones resultan en un incremento en la grasa visceral, hiperinsulinemia y dislipemia [267].

Aunque se tiende a considerar que la aparición de la lipodistrofia está relacionada con TARGA, el síndrome lipodistrófico ha sido descrito también en pacientes no tratados [268], lo que sugiere la existencia de otros mecanismos patogénicos como la participación de citoquinas pro-inflamatorias o la acción directa del virus sobre los adipocitos. De hecho existen sólidos datos sólidos que apuntan a que el riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular en estos pacientes no sólo está relacionado con los efectos adversos de la terapia anti-retroviral sino que son consecuencia de otros efectos patológicos (además de la



inmunodeficiencia) de la infección por VIH. En esta línea, la viremia por VIH y/o la inmunodeficiencia se han asociado con disfunción endotelial, hipercoagulabilidad, daño vascular e inflamación con elevación de la proteína C reactiva, siendo estos efectos independientes de la terapia anti-retroviral [269].

La patogenia de la lipodistrofia asociada a la infección por VIH se ha relacionado con alteraciones en la función mitocondrial y con una disfunción en la adipogénesis [270] [271]. Diversos estudios han sugerido que los efectos tóxicos de los NRTI sobre las mitocondrias son los responsables del síndrome lipodistrófico [270]. Los NRTI tienen afinidad por la ADN polimerasa gamma mitocondrial humana pudiendo causar una disminución en la cantidad y calidad del ADN mitocondrial. Esta disfunción mitocondrial podría llevar a la apoptosis y a la pérdida de los adipocitos [272]. Por otra parte, los PI parece que ejercen su acción tóxica sobre el tejido adiposo alterando la adipogénesis. Así, se ha encontrado que los PI inhiben la translocación nuclear de SREBP1 provocando su acumulación en la membrana nuclear e impidiendo su función sobre la diferenciación de los adipocitos [273].



Figura 1.19: Lipodistrofia asociada al TARGA de la infección por VIH. Nótese marcada pérdida de grasa en la cara. (<http://www.wellness.com/reference/allergies/hiv-associated-lipodystrophy>)



Figura 1.20: Lipohipertrofia (giba de búfalo) asociada a TARGA en la infección por VIH. (<http://www.americanhealthandbeauty.com/articles/?article=1610>)

#### 1.3.1.4. Lipodistrofias localizadas

Existen además, lipodistrofias localizadas que se caracterizan por pérdida selectiva del tejido adiposo circunscrita a un área o áreas del cuerpo. Suelen ser zonas únicas o múltiples bien demarcadas y deprimidas debido a la atrofia del tejido celular subcutáneo. Pueden ser causadas por fármacos, presión, paniculitis u otros mecanismos aún desconocidos [151] [241].

##### *1.3.1.4.A. Lipodistrofia localizada inducida por fármacos*

Este tipo de lipodistrofia es una complicación que puede presentarse en la insulino terapia (Figura 1.21). El mecanismo responsable probablemente es de naturaleza inmunológica, dada la presencia de títulos altos de anticuerpos anti-insulina [274] y al depósito local de IgA y C3. No obstante, no se puede descartar que estén involucrados otros mecanismos, como la presencia de lipasas o el traumatismo repetido. Otros fármacos, como los esteroides y antibióticos, pueden originar una lipodistrofia localizada [251] .

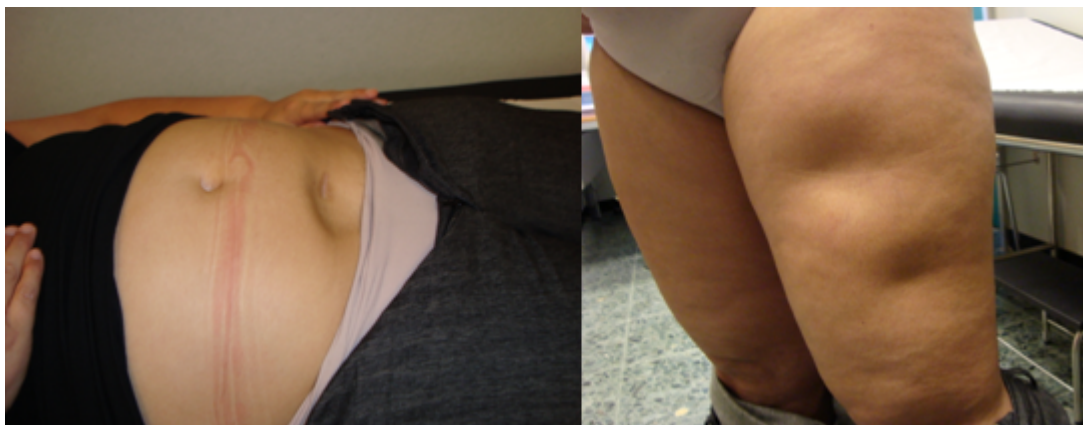


Figura 1.21: Lipodistrofia localizada en relación con la inyección subcutánea de insulina recombinante humana. (Cortesía del Prof. Araújo-Vilar en Peteiro-González *et al.*, 2011 [275])

#### *1.3.1.4.B. Lipodistrofia localizada inducida por presión*

La presión repetida sobre una parte del cuerpo puede dar lugar a una atrofia del tejido adiposo subcutáneo como consecuencia de microtraumatismos o de una reducción de la perfusión. Cuando la presión desaparece, la lipoatrofia mejora. En este apartado se incluiría la lipoatrofia semicircularis [276] [277], un raro trastorno caracterizado por una atrofia del tejido adiposo que afecta como una banda a la mitad del aspecto anterolateral o posterior de los muslos.

#### *1.3.1.4.C. Lipodistrofia localizada y paniculitis*

Se han descrito casos de lipodistrofia localizada secundaria a paniculitis aguda que no se generalizó posteriormente. En sentido estricto, aquí deberíamos hablar de “lipoatrofia” localizada, que es el término de elección cuando la pérdida de tejido adiposo es consecuencia de un proceso inflamatorio previo que afecta al subcutis, mientras que “lipodistrofia” significa ausencia de tejido adiposo sin evidencia de inflamación [278].

#### *1.3.1.4.D. Lipodistrofia centrífuga*

Se trata de un trastorno de etiología desconocida, y la mayoría de los casos se han descrito en países orientales (Japón, Corea y Singapur). La pérdida de grasa suele iniciarse antes de los 3 años de edad, comenzando en las ingles o axilas y zonas adyacentes y extendiéndose posteriormente al resto de la pared torácica o abdomen, y presentan cambios eritematosos y descamativos en la periferia. La anatomía patológica muestra una atrofia del tejido adiposo e infiltrados de linfocitos e histiocitos en las regiones periféricas. La diseminación centrífuga cesa normalmente entre los 3 y los 8 años. Posteriormente, más de la mitad de los pacientes se



recuperan espontáneamente. No hay evidencias de una etiopatogenia inmunológica, salvo los infiltrados linfocitarios [279].

### 1.3.2. LIPODISTROFIAS FAMILIARES

Las lipodistrofias familiares o genéticas pueden ser subclasificadas en generalizadas, parciales o sistémicas (Tabla 1.2).

Tabla 1.2: Clasificación de las lipodistrofias familiares.

---

1.	Lipodistrofias generalizadas
•	Lipodistrofia congénita generalizada (CGL) o síndrome de Berardinelli-Seip
	CGL tipo 1 por mutaciones en <i>AGPAT2</i> (MIM 608594)
	CGL tipo 2 por mutaciones en <i>BSCL2</i> (MIM 269700)
	CGL tipo 3 por mutaciones en <i>CAV1</i> (MIM 612526)
	CGL tipo 4 por mutaciones en <i>PTRF-cavin</i> (MIM 613327)
•	Lipodistrofia generalizada de inicio en la pubertad por mutaciones en <i>LMNA</i> (MIM 608056)
2.	Lipodistrofias parciales
•	Lipodistrofia parcial familiar (FPL)
	FPL tipo 1 (enfermedad de Kobberling), (MIM 808600)
	FPL tipo 2 (enfermedad de Dunnigan) por mutaciones en <i>LMNA</i> (MIM 151660)
	FPL tipo 3 por mutaciones en <i>PPARG</i> (MIM 604367)
	FPL por mutaciones en <i>AKT2</i> (MIM 164731)
	FPL por mutaciones en perilipin 1 ( <i>PLIN1</i> )
	FPL por mutaciones en <i>CAV1</i> MIM 601047
	FPL por mutaciones en <i>CIDEA</i>
3.	Lipodistrofias sistémicas
•	Lipodistrofia asociada con el síndrome de SHORT (MIM 269880)
•	Lipodistrofia asociada con displasia mandibuloacral por mutaciones en <i>ZMPSTE24</i> (zinc metaloproteinasas) (patrón tipo B) (MIM 608612)
•	Lipodistrofia asociada con displasia mandibuloacral por mutaciones en <i>LMNA</i> (patrón tipo A) (MIM 248370)
•	Lipodistrofia asociada con el síndrome progeroide neonatal (MIM 264090)
•	Lipodistrofia asociada con el síndrome de progeria Hutchinson-Gilford (MIM 176670) y síndromes progeroides atípicos por mutaciones en <i>LMNA</i>
•	Lipodistrofia asociada con el síndrome progeroide de Néstor-Guillermo (NGPS) por mutación en <i>BANF1</i> (MIM 603811)

---

### 1.3.2.1. Lipodistrofias familiares generalizadas

#### 1.3.2.1.A. Lipodistrofia congénita generalizada (CGL)

La lipodistrofia congénita generalizada tipo Berardinelli-Seip o síndrome de Berardinelli-Seip (CGL o BSCL), fue descrita por primera vez hace más de medio siglo por Berardinelli en Brasil y posteriormente por Seip en Noruega [280] [281]. CGL es una enfermedad autosómica recesiva muy rara, con una prevalencia estimada de 1:1000.000 en USA y 1:500.000 en Portugal. Se caracteriza por una ausencia casi total de tejido adiposo desde el nacimiento o primera infancia que resulta en una llamativa apariencia muscular generalizada, aunque también suele estar presente una hipertrofia muscular propiamente dicha.

Hasta la fecha se han identificado cuatro loci para CGL: 1-acilglicerol-3-fosfato-O-aciltransferasa 2 (*AGPAT2*), lipodistrofia congénita de Berardinelli-Seip 2 (*BSCL2/seipin*), caveolin 1 (*CAVI*) y *PTRF-cavin*.

Durante la niñez, los individuos afectados presentan crecimiento acelerado, apetito voraz, rasgos acromegaloides y edad ósea avanzada [282] [283] [284]. Es común además, la presencia de hernia umbilical. Durante la niñez o la adolescencia frecuentemente desarrollan una acantosis nigricans manifiesta (Figura 1.24) y acrocordones. Otra característica de CGL es, en ocasiones, el desarrollo postpuberal de lesiones líticas en los huesos apendiculares, más frecuentes en BSCL1 (BSCL por mutaciones en *AGPAT2*) [284]. Algunos pacientes también presentan miocardiopatía (25%) y retraso mental leve-moderado (un 80% en BSCL2 y un 10% en BSCL1) [282] [285] [286].

En casi todos estos pacientes es notable la hiperinsulinemia en ayuno y postprandial. Frecuentemente desarrollan diabetes mellitus en la pubertad y suelen necesitar dosis de insulina extremadamente altas para su control. Otro trastorno metabólico presente es la hipertrigliceridemia que genera esteatosis hepática y puede progresar a cirrosis con sus consiguientes complicaciones [282].

Los niveles plasmáticos de adipoquinas como adiponectina y leptina son considerablemente bajos, lo cual es coherente con la casi total ausencia de grasa corporal [287]. Aunque existen diferencias en los niveles de adiponectina entre BSCL1 y BSCL2 [288].

Las mujeres con CGL pueden presentar hirsutismo, el síndrome de ovario poliquístico (PCOS) e irregularidades menstruales; mientras que en los hombres no parece verse afectada la función reproductiva [289].

La esperanza de vida se acorta (sobre los 50 años) en relación con el desarrollo de cirrosis hepática, miocardiopatía hipertrófica y las complicaciones de la diabetes.

### CGL tipo 1

El origen genético de CGL fue localizado por primera vez en el cromosoma 9q34 [290]; este locus ha sido designado como lipodistrofia congénita generalizada tipo 1 (BSCL1) (MIM 608594) [290]. BSCL1 es causada por mutaciones en el gen *AGPAT2* (Figura 1.22), que codifica para la enzima 1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa 2 [291].

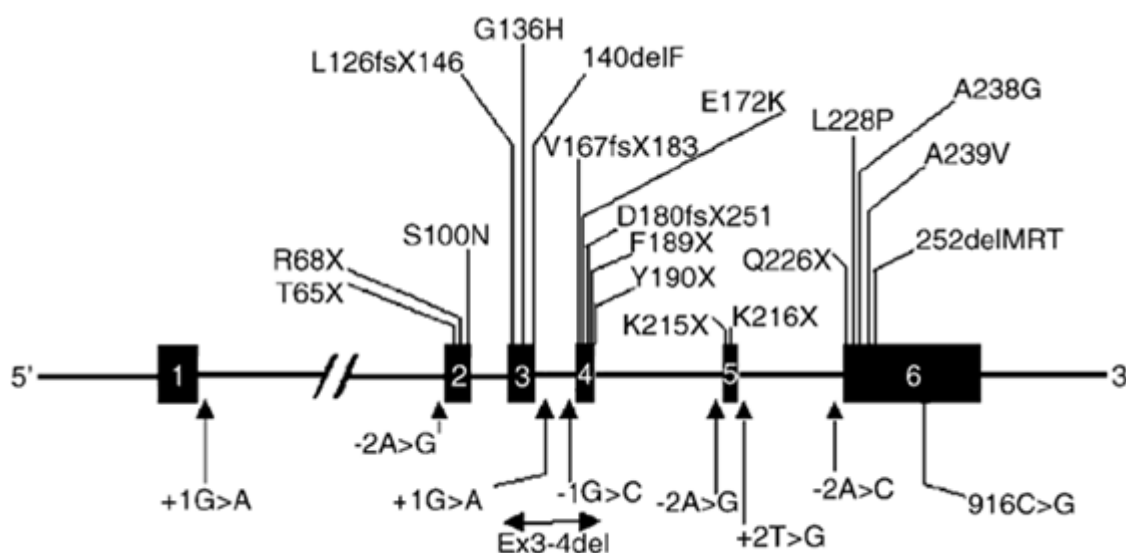


Figura 1.22: Mutaciones descritas del gen *AGPAT2*, encontradas en individuos afectados con LCG. Los cuadros en negro representan los exones. (Tomada de: Agarwal *et al.*, 2004 [292])

*AGPAT2* forma parte de una familia de isoformas de aciltransferasas que catalizan la formación del ácido fosfatídico a partir del ácido lisofosfatídico (Figura 1.23). Este es un paso intermedio clave en la biosíntesis de glicerofosfolípidos y triglicéridos necesarios para la formación de gotas de lípidos [292].

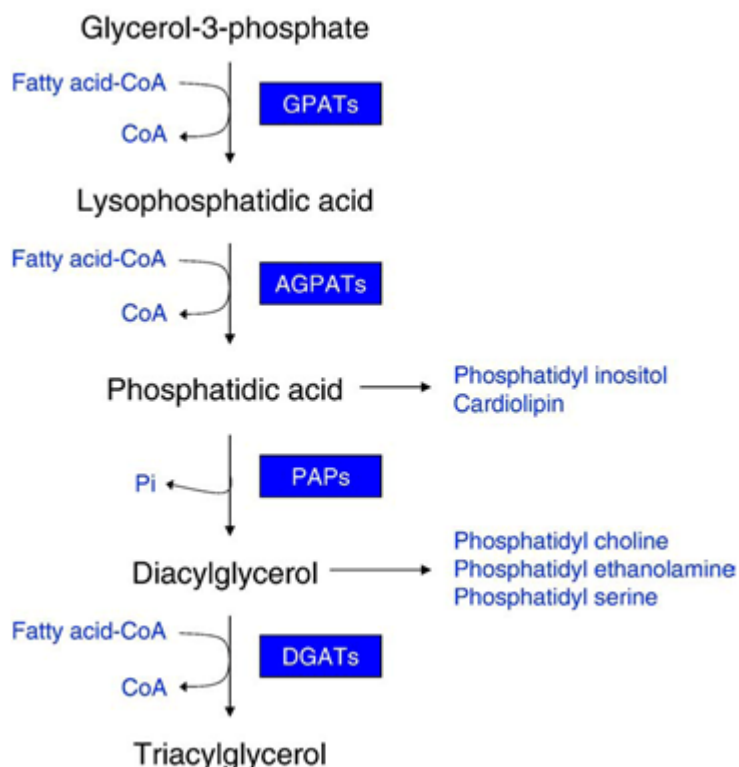


Figura 1.23: Ruta de biosíntesis de triglicéridos y glicerofosfolípidos en el tejido adiposo. El tejido adiposo requiere de glicerol-3-fosfato como sustrato inicial para la biosíntesis de triglicéridos y glicerofosfolípidos. Las enzimas 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasas (AGPATs o LPAATs) catalizan el paso intermedio de acetilación de ácido lisofosfatídico (LPA) en la posición sn-2 que origina la formación de ácido fosfatídico (PA). GPATs: glicerol-3-fosfato aciltransferasas, DGATs: diacylglicerol aciltransferasas, PAPs: ácido fosfático fosfatasas. (Tomada de: Garg, Agarwal, 2009 [39])

Todas las isoformas que han sido estudiadas se localizan en el RE, donde se inicia la formación de las gotas de lípidos. Se ha demostrado que el ARNm de AGPAT2 tiene una alta expresión en fibroblastos murinos, células 3T3-L1 y tejido adiposo omental humano. La proteína AGPAT2 está formada por 278 aminoácidos y posee dos dominios altamente conservados, necesarios para la actividad enzimática [293] [294]. Sin embargo, en unas pocas mutaciones producidas naturalmente se ha visto también un papel importante del extremo carboxilo terminal en la actividad enzimática [295]. La actividad reducida de AGPAT2 en el tejido adiposo podría provocar lipodistrofia debido a la escasa síntesis de triglicéridos o debido a una función anormal del adipocito por la carencia de fosfolípidos [292].

El gen *AGPAT2* está mutado en cerca del 50% de los pacientes con BSCL típica y la enfermedad se hereda recesivamente, siendo la mayoría de los pacientes homocigóticos para estas mutaciones. Se han descrito 33 mutaciones diferentes en 110 pacientes: la mayoría son mutaciones sin sentido y 8 son mutaciones de sentido equivocado. Esta forma de CGL se ha

encontrado fundamentalmente en pacientes de ancestros africanos, aunque también se ha visto en pacientes Caucásicos. A nivel clínico, la lipoatrofia implica a todos los depósitos de grasa, excepto a la grasa mecánica (Figura 1.24). Las alteraciones metabólicas son más leves que las descritas en los pacientes BSCL2; son más frecuentes las lesiones líticas y no suele estar asociada a retraso mental [257]. Estudios *in vitro* mediante siRNA han puesto de manifiesto que el silenciamiento de *AGPAT2* inhibe la acumulación de triglicéridos y frena la adipogénesis [296].



Figura 1.24: Características clínicas en una joven de 16 años afectada con lipodistrofia congénita generalizada tipo 1 (BSCL1). Vista anterior que muestra casi ausencia total de TAsc en la cara, cuello, tronco y extremidades, apariencia musculosa, características acromegaloides, hernia umbilical y acantosis nígricans severa en axilas y tronco. (Tomada de: Garg *et al.*, 1999 [290])

## CGL tipo 2

Un estudio genético de familias CGL en Líbano y Noruega permitió la identificación de un segundo locus en el cromosoma 11q13 [8], actualmente designado como lipodistrofia congénita generalizada tipo 2 (BSCL2) (MIM 269700). El gen responsable dentro de este locus, llamado *BSCL2* (MIM 606158), codifica para una proteína integral de membrana de 462 aminoácidos con un lazo luminal largo entre dos hélices transmembrana, con ambos extremos N y C terminal en el citosol, localizada en el retículo endoplasmático de células eucariotas, denominada seipina o “seipin” [8] [297] (Figura 1.25).

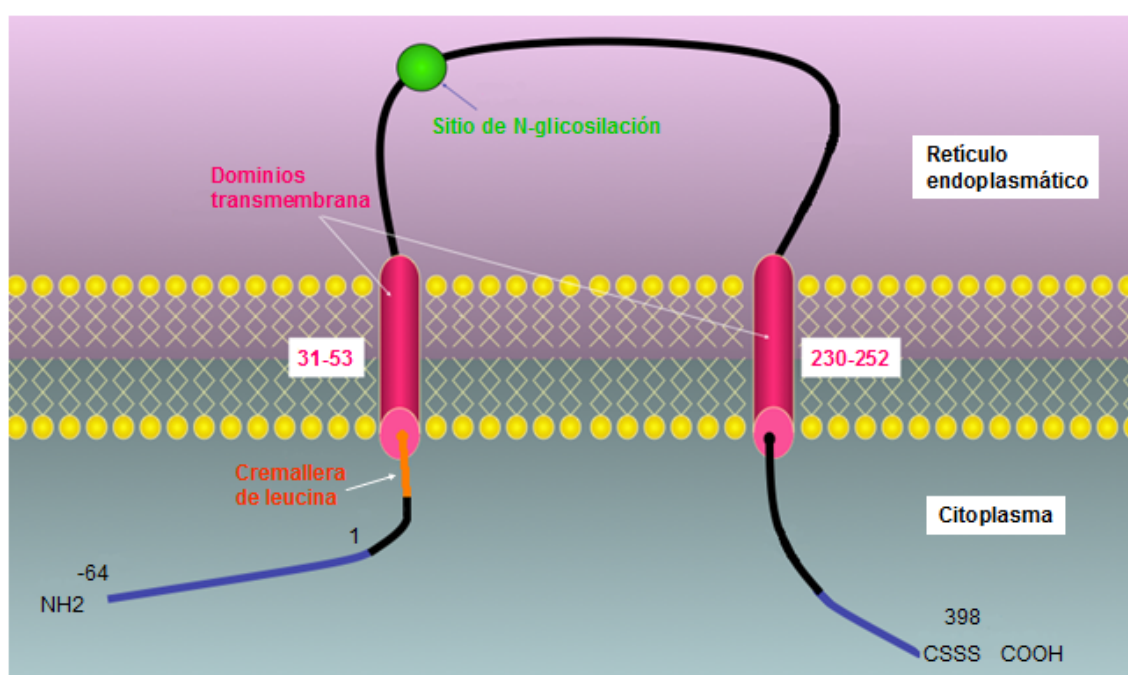


Figura 1.25: Representación esquemática de la estructura y localización de la proteína seipina humana en la célula. Contiene dos dominios hidrofóbicos transmembrana (en rosa) y un dominio cremallera de leucina (en naranja). El modelo topológico basado en un ensayo de protección a proteinasas muestra a la seipina con sus extremos NH2- y COOH-terminal en el citoplasma y su región de lazo en el lumen del retículo endoplasmático. Se muestra un motivo de glicosilación (en verde). (Modificada de: Ito and Suzuki, 2009 [298])

La seipina se expresa selectivamente en las motoneuronas de la médula espinal, en neuronas corticales, en las espermátidas, en el lóbulo anterior de la hipófisis [299] y en el tejido adiposo [300] [301].

Estudios recientes han revelado algunas funciones de esta proteína [300] [302] [301] [303] [299] [304]:

La seipina ha sido vinculada con los procesos de síntesis de triglicéridos y fosfolípidos y con la formación de liposomas [302] [303] [303] [305]. Estudios realizados en levaduras [302]

[303] [305] han demostrado que la seipina juega un papel fundamental en la formación de gotas de lípidos desde el RE. Otros autores han demostrado que la seipina es determinante en el proceso de diferenciación adipocitaria [300]. Estos autores observaron que la inhibición de *BSCL2* mediante shRNA alteraba tanto la acumulación de lípidos durante el proceso de diferenciación como la inducción de factores de diferenciación adipogénicos. Además, existen evidencias de que la seipina es necesaria para el proceso de desaturación de los ácidos grasos [302] [304].

El hecho de que otros genes prominentes implicados en la lipodistrofia generalizada, *LPIN1* (en ratones) y *AGPAT2*, codifican para enzimas claves en la biosíntesis de fosfolípidos/glicerolípidos apoya además un posible papel para la seipina en el metabolismo de fosfolípidos, especialmente del ácido fosfatídico (PA). La pérdida de función de la seipina podría provocar cambios en la concentración y distribución de ciertos fosfolípidos, como un incremento de PA en el retículo endoplasmático y la envoltura nuclear. Este cambio en el PA podría tener efectos específicos de tejido como un bloqueo en la diferenciación de los adipocitos y un incremento en la síntesis de triacilglicerol (TAG), junto con la proliferación y la agregación de gotas de lípidos en los fibroblastos [306]. El PA es un precursor en la síntesis de los principales glicerofosfolípidos y TAG, y tiene también un importante papel en las cascadas de transducción de señales [307]. Es posible que la toxicidad de PA inhiba la adipogénesis, lo más probable, actuando sobre el regulador “master” PPAR $\gamma$  [306]. Recientemente se ha identificado un ligando endógeno para PPAR $\alpha$  en hígado que es un fosfolípido [308]. Dada la similitud estructural y funcional entre PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$ , es posible que ciertas especies de fosfolípidos puedan servir también como, agonistas/antagonistas endógenos de alta afinidad para PPAR $\gamma$ . La hipótesis seipina-PA-PPAR $\gamma$  puede también explicar que en células 3T3-L1 con seipina silenciada se pueda restablecer la adipogénesis por adición de un agonista de PPAR $\gamma$ , la pioglitazona [301].

Los individuos *BSCL2* muestran lipoatrofia severa (casi ausencia total de tejido adiposo), resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia, rasgos acromegaloides y hepatomegalia [309] [292] [310] (Figura 1.30). En la mayoría de los casos, los pacientes presentan mutaciones homocigóticas pero pueden ser también heterocigóticos compuestos. Las mutaciones descritas hasta la fecha son mayoritariamente mutaciones sin sentido o grandes deleciones que parecen conducir a la pérdida de función [8] [286] [285] [311] [312] [313] (Figura 1.26). Resulta significativo que las mutaciones asociadas a *BSCL2* no se localizan en los sitios de N-

glicosilación (NXS/T), en los cuales se han encontrado mutaciones de seipina relacionada con patología de neuronas motoras. Fenotípicamente, no se han descrito anomalías de neurona motora en BSCL2, mientras que en las patologías de neuronas motoras relacionadas con seipina, no se describen comúnmente alteraciones del tejido adiposo o del sistema endocrino [298].

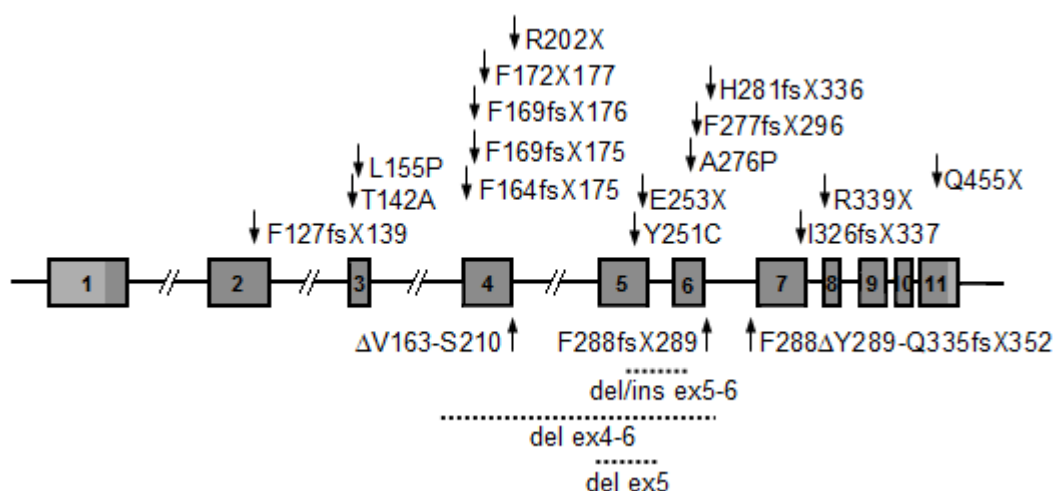


Figura 1.26: El gen de seipina humana y las mutaciones descritas asociadas a lipodistrofia, representadas para la isoforma de 462 aminoácidos (NP\_001116427). Los exones se representan como cuadrados numerados.

Los pacientes BSCL2 están más gravemente afectados que los BSCL1 y frecuentemente presentan retraso mental de leve a moderado. Estos pacientes son frecuentemente caucásicos con una mayor prevalencia de la enfermedad en Europa, el Medio Oriente y Asia. Además, se han identificado pacientes en Brasil, probablemente de origen Portugués [257].

Los mecanismos por los cuales las mutaciones en BSCL2 causan lipodistrofia no están bien definidos:

En 2009, Boutet y colaboradores, al estudiar el perfil lipídico de líneas celulares de linfoblastos de 12 pacientes BSCL2 con mutaciones nulas en el gen que codifica para seipina, encontraron alteraciones en el patrón de gotas de lípidos, las cuales eran más pequeñas y numerosas al compararlas con las células controles. Además, observaron alteraciones en el contenido de triglicéridos, así como en la composición de ácidos grasos de triglicéridos y fosfatidiletanolamina, con un incremento en la proporción de ácidos grasos saturados a expensas de los correspondientes ácidos grasos monoinsaturados, indicando un defecto en la actividad Delta9-desaturasa. Esto hace suponer que seipina estaría involucrada en la ruta que



enlaza la desaturación Delta9 de los ácidos grasos con la formación de las gotas de lípidos [304].

En 2008, Payne y colaboradores realizaron un estudio en células madre mesenquimales humanas y murinas, transfectadas con vectores para la inhibición de la expresión de *BSCL2* o con mutaciones en este gen que causan lipodistrofia. Al inducir diferenciación en dichas células encontraron que durante la adipogénesis se veía afectada la expresión de factores de transcripción críticos como  $PPAR\gamma$  y  $C/EBP\alpha$ , produciéndose además una sostenida reducción de la expresión de genes claves para la síntesis de triglicéridos, acompañada de la inhibición en la acumulación de gotas de lípidos. Esto parece indicar que la seipina juega un papel importante en el desarrollo de los adipocitos maduros [300].

Otro estudio sobre la formación de gotas lipídicas y su relación con seipina, demostró que la ausencia de seipina en levaduras origina gotas lipídicas irregulares, frecuentemente agrupadas junto al ER [303] (Figura 1.27). También se comprobó que la seipina humana puede reemplazar funcionalmente a la seipina de levadura, pero una mutación de sentido equivocado en seipina humana que causa lipodistrofia, o las mutaciones correspondientes en el mismo gen de levadura, hacen que sea incapaz de compensar esta función. Además, estos autores observaron que la seipina de levadura se localiza en el ER, donde parecen estar casi todas las gotas de lípidos. Todo ello hace pensar que seipina está involucrada en la formación y/o mantenimiento de estas gotas de lípidos. Posteriormente, Fei y colaboradores obtuvieron resultados similares [302].

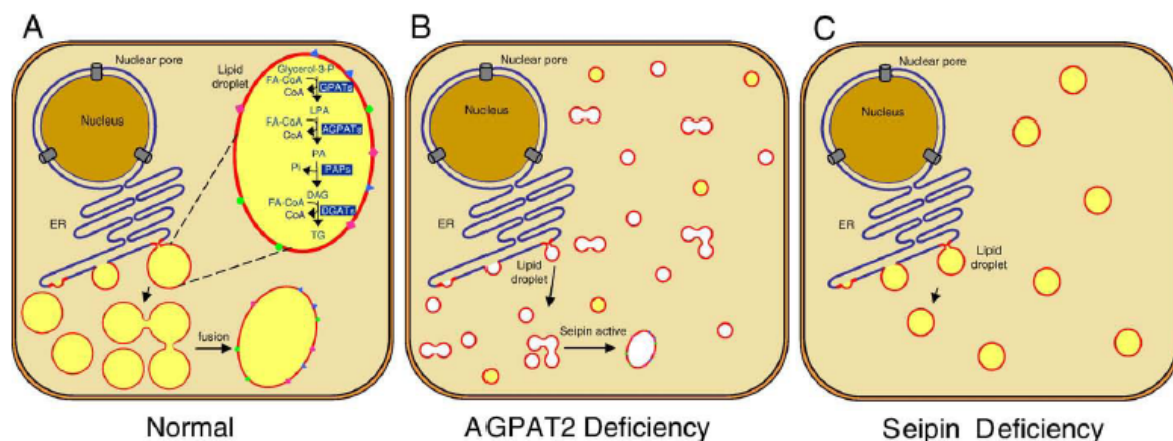


Figura 1.27: Representación esquemática de la formación de gotas de lípidos (GLs) en los adipocitos. A: Formación progresiva de GLs en el retículo endoplasmático (ER) en células normales. Se muestran también las enzimas involucradas en la síntesis de triglicéridos. Las GLs pequeñas se fusionan para formar una o más GLs grandes. B: Síntesis reducida de triglicéridos por la deficiencia de AGPAT2 en pacientes con BSCL1. La fusión puede producirse pero en una escala mucho menor. Se muestran GLs en blanco representando a aquellas que podrían carecer completamente de triglicéridos o con una mínima síntesis de éstos debido a la actividad de otras isoformas de AGPAT2. C: Células con carencia en la expresión de seipina como sucede en pacientes con BSCL2, la fusión de GLs parece no producirse, sin embargo, se pueden seguir sintetizando triglicéridos, por lo que se forman muchas GLs pequeñas en lugar de una o más GLs grandes. (Tomada de: Garg *et al.* 2009 [39])

Recientemente Binns y colaboradores demostraron (en levaduras) que la seipina se organiza como un homo-oligómero constituido por 9 subunidades de seipina, adoptando la forma de un toroide discoide con un hueco central, incrustado en la membrana del ER (Figura 1.28) [305]. Los mismos sugieren que este complejo anular podría estar involucrado en la organización de las gotas de lípidos, quizás formando un collar en la interfase ER-gota lipídica o impidiendo la evaginación de las gotas en el lumen del ER (Figura 1.29).

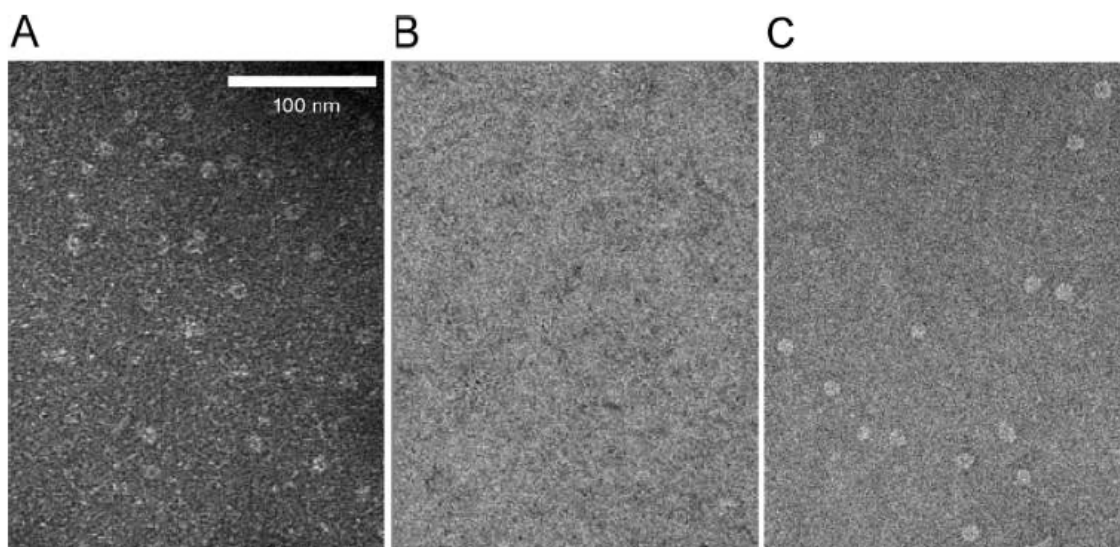


Figura 1.28: La seipina forma un toroide. A y C, Imágenes de microscopía electrónica (por tinción negativa) de seipina-myc13 y Seipina-TEV-myc13, respectivamente, purificadas por afinidad, a partir de células en las que se han sobre-expresado. Ambas aparecen como discos huecos que forman toroides. B, Control negativo, muestra obtenida a partir de células que no expresan seipin-myc13. (Tomada de: Binns *et al.*, 2010 [305])

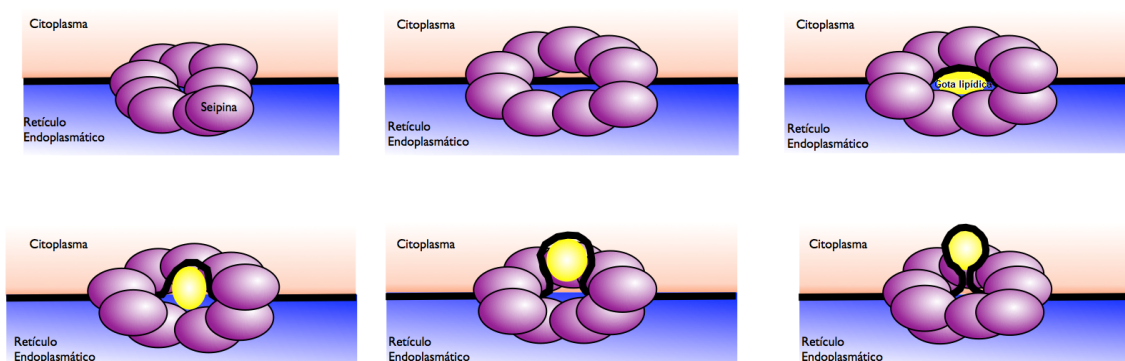


Figura 1.29: Representación esquemática de la hipótesis de Binns y colaboradores, 2010 [305], sobre el papel de la seipina en la organización de las gotas de lípidos, pudiendo formar un collar en la interfase ER-gota lipídica o impidiendo la evaginación de las gotas en el lumen del ER.



Figura 1.30: Mujer con síndrome de Berardinelli-Seip por mutación en BSCL2. Muestra una pérdida generalizada de TAsc, características acromegaloides, hernia umbilical y acantosis nigricans en axilas y brazos. (Tomada de: Araújo-Vilar, 2003 [250])

### CGL tipo 3

Recientemente, Kim y colaboradores identificaron una mutación sin sentido, homocigótica, (p.Glu38X) en el gen Caveolin-1 (CAVI) (BSCL3) [5], en un paciente con BSCL desde su nacimiento. CAVI codifica para caveolina-1 [314], una proteína altamente conservada que es el componente clave de las invaginaciones de la membrana plasmática, conocidas como caveolas [315] [316]. La paciente estudiada presentaba una mutación que genera pérdida de función de la proteína CAV1, y como consecuencia se produjo una lipodistrofia generalizada, resistencia a la insulina y dislipemia. La evaluación clínica y ecografía abdominal de la paciente también reveló hipermusculación, acantosis nigricans, hirsutismo, flebomegalia, hepato-esplenomegalia y esteatosis hepática (Figura 1.31). Este hallazgo proporciona evidencias sobre el papel crítico de CAV1 en la función del adipocito.



Figura 1.31: Paciente con BSCL asociada a una mutación homocigótica sin sentido en *CAV1* (p.Glu38X), a los 8 años y 10 meses de edad (a la izquierda) y a los 20 años de edad (a la derecha). Presenta apariencia musculosa, acantosis nigricans particularmente en el cuello y axilas, prominente abdomen (hígado y bazo), cabello rizado y grueso, hirsutismo y flebomegalia en las extremidades. (Tomada de: Kim *et al*, 2008 [5])

#### CGL tipo 4

Aún más reciente ha sido la identificación de mutaciones en el gen *PTRF* (MIM 284119) asociadas a un síndrome que se presenta con lipodistrofia generalizada y distrofia muscular [6]. El gen *PTRF* codifica para PTRF (“polymerase I and transcript release factor”), una proteína caveolar asociada a la que se le atribuye un papel esencial en la formación de las caveolas y la estabilización de caveolinas. Las mutaciones fueron identificadas en 5 pacientes no consanguíneos, que habían presentado una pérdida generalizada del tejido adiposo desde la niñez. Estos pacientes presentan además hipertrofia muscular y niveles elevados de creatinquinasa en suero, con complicaciones metabólicas asociadas menos severas que en la CGL1 y CGL2 [6]. Además, se ha descrito también en CGL4 la presencia de distrofia muscular y arritmias cardíacas [6],[317] que en algunos casos pueden conducir a la muerte

súbita [317]. Rajad y colaboradores describieron que los músculos de pacientes con un nuevo subtipo de CGL4 son hipertróficos pero débiles y muestran movimientos involuntarios (Figura 1.32) [317].

Con estos datos y los obtenidos por estudios de sobre-expresión de la proteína mutada se confirmó que PTRF es esencial para la formación de las caveolas y la adecuada localización de las caveolinas en células humanas, lo cual sugiere que las características clínicas de los pacientes con mutaciones en PTRF están asociadas con una deficiencia secundaria de caveolinas [6].

Anteriormente se había descrito que los ratones *PTRF-knockout* mimetizan la lipodistrofia de los humanos, mostrando una considerable reducción de la masa de tejido adiposo, hipertrigliceridemia, intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia [318]. PTRF co-localiza con la lipasa sensible a hormonas en los adipocitos y migra al núcleo en presencia de insulina [319], por lo que se cree que PTRF juega un papel importante en el metabolismo lipídico y en la expresión génica regulada por la insulina.



Figura 1.32: Paciente de 12 años con pérdida generalizada del TAsc y prominente hipertrofia muscular, especialmente en muslos, músculos masticadores y para-espinales. Presencia de flebomegalia. Inestabilidad atlanto-axial durante la flexión. Fenotipo asociado a la presencia de una mutación en homocigosis en PTRF-CAVIN. (Tomada de: Rajab *et al.*, 2010 [317])

#### *1.3.2.1.B. Lipodistrofia generalizada con inicio en la pubertad por mutaciones en LMNA*

Se han descrito tres pacientes con lipodistrofia generalizada, diabetes, y características progeroides con nuevas mutaciones de sentido equivocado en *LMNA* [320] [321]. La lipodistrofia parece iniciarse en la pubertad.

#### *1.3.2.2. Lipodistrofias parciales*

##### *1.3.2.2.A. Lipodistrofia parcial familiar (FPL)*

FPL es una enfermedad autosómica, frecuentemente dominante, con una prevalencia estimada en la población mundial de  $< 1$  en 200 mil. Se caracteriza por una pérdida progresiva y gradual de tejido adiposo subcutáneo en las extremidades y nalgas, acompañada de una pérdida variable de tejido adiposo en el tronco, a partir de una edad determinada. Su diagnóstico puede ser asumido en pacientes no obesos con temprana aparición precoz de

diabetes e hipertrigliceridemia, especialmente si presentan una pérdida llamativa de grasa en extremidades y caderas [289].

Hasta la fecha se han identificado cinco loci para la FPL con herencia autosómica dominante: *LMNA* (FPLD2, tipo Dunnigan, MIM #151660) [2], *PPARG* (FPLD3, MIM #604367) [3], *AKT2* (MIM 164731) [4], *CAVI* (MIM 601047) [322] y *PLIN1* [9]; y un loci con herencia autosómica recesiva: *CIDEA* [7].

### **FPLD1**

Se ha identificado una forma de lipodistrofia parcial familiar, FPLD1 (tipo Kobberling, MIM 608600), descrita por Kobberling y colaboradores en 1971 y posteriormente en 1975 [323], en una familia con tres individuos afectados; así como en dos individuos no relacionados. FPLD1 se caracteriza por pérdida de grasa exclusiva de las extremidades, con distribución normal o incremento de la grasa de la cara, cuello y tronco (Figura 1.33). En 2003, Herbs y colaboradores estudiaron a 13 pacientes (no relacionados) con características clínicas de FPLD1 [324]. Estos pacientes presentaban también componentes del síndrome metabólico, como hipertensión, resistencia a la insulina e hipertrigliceridemia severa. Un 31% presentó enfermedad coronaria prematura. Sin embargo, las bases moleculares de la FPLD1 aún se desconocen.



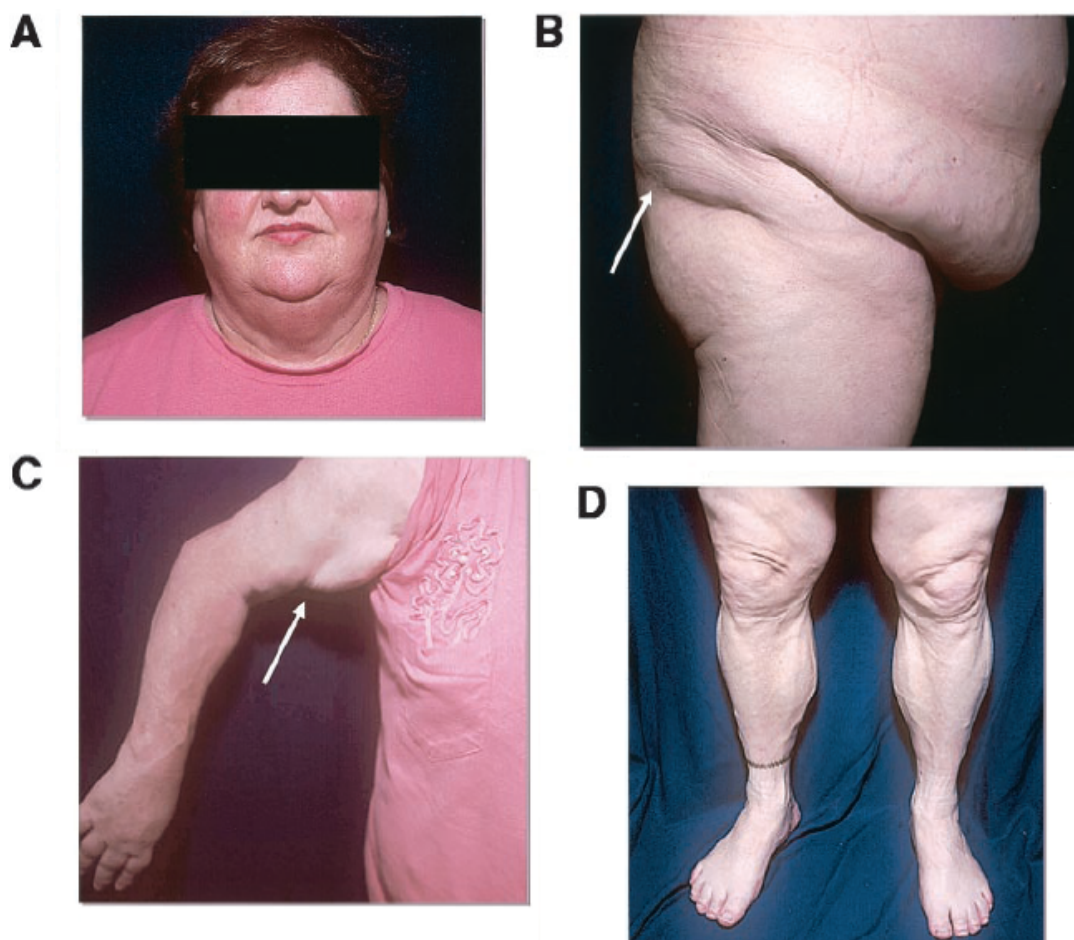


Figura 1.33: Características anatómicas de una paciente con FPLD1. A: Vista de la cara y el cuello que muestran una apariencia “Cushingoide” de la cara, con acumulación de grasa y presencia de sotabarba. B: Vista lateral que permite observar obesidad central y un saliente de grasa sobre la región glútea (flecha). C: Extremidad superior que muestra un saliente de grasa sobre el área del triceps (flecha). D: Extremidades inferiores en las que se aprecia una musculatura y venas prominentes. (Tomada de Herbs *et al.* 2003 [324])

## FPLD2

FPL tipo Dunnigan (FPLD2) descrita por primera vez en 1974 por Dunnigan y colaboradores [325], resulta de mutaciones heterocigóticas en el gen *LMNA* (MIM 151660) [2] [326], localizado en el cromosoma 1q21–22 [327], que codifica para las proteínas nucleares lamina A/C (Figura 1.10). La mayoría de las mutaciones en *LMNA* que originan FPLD2 son de sentido equivocado. Hasta la fecha se ha identificado sólo una mutación de *splicing* [328] (Figura 1.36).

Recientemente se ha descrito una nueva forma de FPLD en siete mujeres precedentes de la Isla de La Reunión [329]. Estas pacientes presentaban un severo síndrome de lipodistrofia parcial con diabetes y/o acantosis nigricans, esteatosis hepática, hipertrigliceridemia, y bajos

niveles de leptina y adiponectina sérica. Tres pacientes presentaban además graves alteraciones del ritmo y la conducción cardíaca. En todos los pacientes se identificó una mutación homocigótica (*LMNA* p.T655fsX49) que provoca la expresión de una prelamina A mutada con 48 aminoácidos aberrantes en el extremo C-terminal que impide su farnesilación fisiológica y maduración postraducción. En los fibroblastos cultivados de los pacientes, la prelamina A mutada (no farnesilada) fue asociada con dimorfismos nucleares típicos de las laminopatías, incremento del estrés oxidativo y senescencia precoz. Los familiares con la mutación en heterocigosis fueron asintomáticos o parcialmente afectados.

Los pacientes FPLD2 presentan una pérdida gradual de tejido adiposo subcutáneo en las extremidades y el tronco (sobre todo en la región glútea) a partir de la pubertad en las mujeres, mientras que en los hombres estas manifestaciones suelen presentarse después de los 40 años [330]. Es por ello que, durante la infancia, los individuos afectados no se pueden distinguir fácilmente desde el punto de vista clínico de aquellos no afectados. Esta pérdida de grasa en las extremidades deja ver una prominente y bien definida musculatura, así como flebomegalia. A la vez, presentan un incremento de los depósitos de grasa en la cara, sotabarba, cuello (Figura 1.34), axilas, espalda, labios mayores y región intra-abdominal [289]. Como en otros cuadros que cursan con resistencia a la insulina estos pacientes pueden presentar acantosis nigricans y acrocordones. En las mujeres afectadas, el hirsutismo, las anormalidades menstruales y el PCOS se presentan de forma variable [331]. También se ha descrito la presencia de manos grandes, mamas hipoplásicas y lipomatosis múltiple [332].



Figura 1.34: Mujer caucásica de 37 años con lipodistrofia parcial familiar tipo Dunnigan, debido a una mutación heterocigótica en *LMNA*. Muestra pérdida de tejido adiposo subcutáneo en tronco y extremidades que se inició en la pubertad, acompañada de un exceso de grasa en la cara y el cuello. (Tomada de: Agarwal and Garg, 2006 [289])

FPLD2 se caracteriza, desde el punto de vista bioquímico, por la resistencia a la insulina e hipertrigliceridemia, pudiendo, los individuos predispuestos, desarrollar diabetes mellitus. Estudios realizados en pedigríes de FPLD han demostrado la presencia de cambios similares a los observados en el síndrome metabólico, que incluyen incremento de triglicéridos, ácidos grasos libres, de la proteína C-reactiva y TNF alfa en plasma, así como, la disminución de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) [333]. Además, el perfil bioquímico en la FPLD incluye bajas concentraciones de leptina y adiponectina en suero [334] [333] [250]. Se ha observado que los individuos FPL con mutación en *LMNA*, especialmente las mujeres, presentan riesgo elevado de padecer aterosclerosis y enfermedad cardiovascular [334].

Entre las distintas mutaciones de sentido equivocado en *LMNA* que conducen a la FPLD2, se han visto pequeñas diferencias en la severidad de las manifestaciones clínicas. Sin embargo, la única mutación de *splicing* descrita se encontró en dos hermanas con un fenotipo de FPLD muy severo [328]. La severidad del fenotipo en FPLD puede también ser modulada por la combinación de más de una mutación en un mismo paciente, originando una forma más severa de este trastorno [335].

Después de la identificación del locus FPLD2, se describió una mutación de sentido equivocado, Arg482Gln, en *LMNA*, en un pedigrí canadiense [2]. Subsecuentemente se describieron otras mutaciones de sentido equivocado en *LMNA* en pacientes con FPLD, la mayoría de éstas consisten en sustituciones en residuos del extremo C-terminal [326] [336] [337]. Ya que algunos pacientes manifiestan solapamiento con manifestaciones clínicas de miopatía y miocardiopatía, en 2002, Garg y colaboradores plantearon que las mutaciones en *LMNA* causan un síndrome de distrofia multisistémica [338].

La mayoría de las mutaciones de sentido equivocado en FPLD2 afectan al residuo de arginina en la posición 482 localizado en el exón 8, el cual codifica para la porción globular de la proteína. Resulta menos severa la FPLD2 asociada a la mutación Arg582His en el exon 11 (la cual sólo afecta a la lamina A y no a la lamina C) [339]. Mutaciones en el exón 1 causan FPLD y miocardiopatía [338]. Recientemente, Subramanyam y colaboradores describieron tres nuevos pedigríes FPLD que presentaban asociada miocardiopatía, con mutaciones heterocigóticas en la región amino-terminal de *LMNA*. Dos de ellos presentaban mutaciones descritas anteriormente (R60G y R62G) y en el tercero se encontró una nueva mutación, la D192V [340].

Clínicamente está bien establecido que existe un dimorfismo sexual en FPLD2. Resulta más fácil de reconocer la FPLD2 en las mujeres que en los hombres, debido al incremento de la definición de los músculos en las extremidades [331], así como a la distribución andrógina de la grasa corporal y la precocidad en la aparición de la lipodistrofia [341]. Cerca del 20-33% de las pacientes presentan acantosis nigricans, hirsutismo, irregularidades menstruales y ovarios poliquísticos [331], así como un aumento de la frecuencia de abortos [342].

Varios estudios han demostrado que la prevalencia de trastornos metabólicos relacionados con resistencia a la insulina, como dislipidemia, diabetes mellitus, hipertensión y enfermedad vascular aterosclerótica, es mayor en las mujeres que en los hombres [331] [334], particularmente en mujeres multíparas con mayores depósitos de tejido adiposo central [343]. En los estudios realizados por Garg y colaboradores, se ha visto que las mujeres tienen el doble de prevalencia de diabetes, así como, tres veces mayor prevalencia de enfermedad vascular aterosclerótica, con respecto a los hombres con FPLD2 [331]. Estos mismos autores encontraron, además, que las mujeres con FPLD tenían niveles de triglicéridos significativamente más altos y concentraciones de colesterol HDL significativamente más bajos que los hombres. Pueden existir varias explicaciones a esta predisposición de las mujeres con FPLD2 a desarrollar complicaciones relacionadas con la resistencia insulina. Primero, las mujeres poseen mayor acumulación de grasa subcutánea periférica comparadas con los hombres, como consecuencia las mujeres con FPLD2 están sujetas a más pérdida de grasa periférica que los hombres. Segundo, durante el embarazo se produce un eficiente almacenamiento de grasa, pero como las mujeres con FPLD no podrían acumular grasa en la mayoría de las regiones subcutáneas, entonces la acumularían en la región intra-abdominal, condicionando una predisposición a complicaciones metabólicas. En 2003, Haque y colaboradores encontraron que entre los factores de riesgo para la diabetes en mujeres con FPLD2 están la multiparidad y la acumulación de grasa en regiones no lipodistróficas como la sotabarba [343]; observación ésta que resulta coherente con las explicaciones anteriores.

### **FPLD3**

FPLD también puede originarse por una de las más de doce mutaciones heterocigóticas descritas en el gen *PPARG* que codifica para el receptor nuclear “peroxisome proliferator activated receptor-gamma” (PPAR $\gamma$ ), (MIM 601487, localizado en el cromosoma 3p25) [3] [344] [345] [346] [347] [348] [349] [350] [351]. Hasta la fecha se han descrito sólo cerca de unos 20 pacientes con FPL debido a mutaciones en *PPARG* (FPLD3) [352].

La pérdida de grasa subcutánea se produce en las extremidades y nalgas, sin embargo la grasa facial puede no verse afectada (Figura 1.35). Dado el papel crítico de PPAR $\gamma$  en la adipogénesis y su elevada expresión en los adipocitos, las mutaciones podrían causar lipodistrofia debido a alteraciones en la adipogénesis [105]. El por qué la lipodistrofia se restringe a determinados depósitos de tejido adiposo aún se desconoce.

Se han propuesto dos mecanismos, “dominante negativo” y “haploinsuficiencia”, para explicar la patogenicidad de las mutaciones de *PPARG*. De acuerdo con la hipótesis del dominante negativo, el alelo mutante afecta la función del alelo *wild type* por interferencia directa, compitiendo por la unión al ADN. En el caso de la haploinsuficiencia, se produce sólo una reducción del 50% en la expresión génica como consecuencia de un alelo no funcional.

En 2006, Agostini y colaboradores describieron una posible explicación para el mecanismo del “dominante negativo” en las mutaciones de *PPARG*. Estos autores observaron que los receptores mutantes carecen de unión al ADN y actividad transcripcional, pero sí pueden migrar al núcleo para interactuar con los coactivadores de PPAR $\gamma$  e inhibir así al receptor de fenotipo *wild type* co-expresado, provocando una disminución de la expresión de genes diana de PPAR $\gamma$  [344]. De modo general, los mecanismos a través de los cuales las mutaciones de los receptores PPAR $\gamma$  conducen a un fenotipo lipodistrófico son complejos y aparentemente variados [348].

Al comparar FPL debido a mutaciones en *PPARG* (FPLD3) con respecto a la FPLD2, a nivel clínico y bioquímico, la primera parece estar asociada con:

- 1) Una pérdida menos severa de tejido adiposo, que aparece a una edad variable, pudiendo presentarse después de los 50 años
- 2) Las manifestaciones clínicas como acantosis nigricans, esteatosis hepática, PCOS e hirsutismo son más severas y/o más tempranas
- 3) Hipertensión arterial más severa
- 4) Aparición más temprana de diabetes mellitus tipo 2
- 5) Mayor resistencia a la insulina
- 6) Marcada disminución de adipoquinas.
- 7) Respuesta bioquímica variable al tratamiento con tiazolidinedionas

Otra clara diferencia es la aparición temprana de enfermedad cardíaca entre las mujeres con FPLD2 [334]; así como la mayor incidencia de aterosclerosis precoz en las mujeres FPLD2 cuando se comparan con las mujeres afectadas por FPLD3. Además, parece que los trastornos clínicos y bioquímicos no se producen en proporción con la extensión de la lipodistrofia en individuos con FPL asociada a *PPARG* si se comparan con individuos FPLD2; esto sugiere que las mutaciones en *PPARG* podrían tener efectos adicionales e independientes sobre el metabolismo.



Figura 1.35: Aspectos clínicos de una paciente con FPLD3. A y B, Vistas frontal y lateral que muestran una apariencia masculina con lipodistrofia moderada en el tronco; C-E, acantosis nigricans en el cuello, axila y pies; F, xantoma eruptivo (Tomada de Monajemi *et al.* 2007 [350])

### FPL por mutaciones en *AKT2*

El tercer locus descrito para FPL es *AKT2* (“v-AKT murine thymoma oncogene homolog 2”), localizado en el cromosoma 19q13.1-q13.2. Fue en 2004 cuando George y colaboradores identificaron una mutación de sentido equivocado en el dominio quinasa de Akt2 (R274H), en una única familia con severa resistencia a la insulina y diabetes heredada de forma autosómica dominante [4]. Los individuos afectados de esta familia presentaron lipodistrofia parcial [4], lo que sugiere que Akt2 podría jugar un papel en la adipogénesis. Akt2, también conocida como proteinquinasa B (PKB), pertenece a la familia de serin/treonin quinasas dependientes de fosfoinositol. Esta proteína se expresa fundamentalmente en tejidos sensibles a la insulina y está involucrada en la señalización post-receptor de esta hormona. Es por ello que la lipodistrofia en pacientes con mutaciones en *AKT2* podría estar relacionada con una reducción en la diferenciación de los adipocitos y alteraciones en la señalización post-receptor de la insulina.

### FPL por mutaciones en perilipin 1 (*PLIN1*)

Perilipin1 es la proteína específica de adipocito más abundante, recubre las gotas de lípidos y es necesaria para la óptima incorporación y liberación lipídica de la gota. Perilipin 1 está codificada por el gen *PLIN1*, localizado en el cromosoma 15q26. Recientemente, se han identificado dos mutaciones heterocigóticas diferentes en *PLIN1* que originan *frameshift* (p.L404VfsX158 y p.V398GfsX166), en tres familias con lipodistrofia parcial (pérdida de TAsc en extremidades inferiores y grasa normal en la parte superior del cuerpo), hipertrofia muscular (Figura 1.36), dislipidemia severa y diabetes insulino-resistente [9]. El TAsc de estos pacientes se caracterizó por adipocitos más pequeños de lo normal, infiltración de macrófagos, y fibrosis. Además, las formas mutantes de la proteína, a diferencia de las formas *wild type*, no fueron capaces de incrementar la acumulación de triglicéridos cuando fueron expresadas (en heterocigocis) en preadipocitos. Estos hallazgos definen una nueva forma dominante de lipodistrofia familiar y resaltan las serias consecuencias metabólicas de un defecto primario en la formación de gotas de lípidos en el tejido adiposo.



Figura 1.36: Vista posterior de tres hermanas afectadas por un *frameshift* en heterocigocis en el gen *PLIN1*. Las pacientes muestran escaso tejido adiposo subcutáneo y una apariencia musculosa. (Tomada de Gandotra *et al.* 2011 [9])



**FPL por mutaciones en CAV1**

En 2008, Cao y colaboradores encontraron una mutación heterocigótica que genera *frameshift* (I134fsdelA-X137) en *CAVI*, en dos miembros de una familia (hija y padre) que presentaban lipodistrofia parcial atípica con pérdida de TAsc en las extremidades superiores y la cara; mientras que se encontró un incremento de grasa en las piernas, región glútea y en los depósitos de grasa visceral. La hija presentaba una severa hiperlipoproteinemia tipo V, con pancreatitis recurrente. Además, mostraba algunas características atípicas que incluyen cataratas congénitas, retinitis pigmentosa y alteraciones neurológicas. Su padre también presentaba hipertrigliceridemia, cataratas congénitas, retinitis pigmentosa y alteraciones neurológicas leves. Este mismo estudio incluyó el diagnóstico de un paciente no relacionado que presentaba una mutación heterocigótica en la región 5'UTR (-88delC) diferente en el gen *CAVI* que potencialmente afecta al marco de lectura. Este paciente tenía un fenotipo de lipodistrofia parcial, con pérdida de TAsc en extremidades superiores e inferiores, así como en la región glútea, mientras que la grasa de la cara, cuello y depósitos viscerales estaba incrementada. También presentaba hiperlipoproteinemia tipo V severa con pancreatitis recurrente; sin embargo clínicamente no manifestaba afecciones neurológicas [322].

### FPL por mutaciones en *CIDE*C

Recientemente, ha sido descrito un nuevo locus asociado a lipodistrofia parcial, el gen “lipid droplet protein cell death-inducing DFFA-like effector C” (*CIDE*C), localizado en el cromosoma 3p25. En el estudio se describe a una paciente con lipodistrofia parcial (afectando extremidades, región glúteo-femoral y tejido adiposo subcutáneo abdominal) (Figura 1.37), diabetes y resistencia a la insulina. En esta paciente se encontró una mutación en homocigocis en *CIDE*C que genera una proteína truncada prematuramente (E186X). Los estudios histológicos revelaron adipocitos blancos con gotas de lípidos multiloculadas y un exceso de la masa mitocondrial. Los estudios funcionales de la proteína mutada indicaron que ésta no es capaz de incrementar el tamaño de las gotas de lípidos en las células transfectadas como lo hace la proteína *wild type*. El acortamiento de la proteína altera el dominio CIDE-C altamente conservado y la proteína mutada no es correctamente señalizada. Con estos hallazgos los autores sugieren que *CIDE*C es necesaria para la formación de gotas uniloculares de lípidos y el óptimo almacenamiento de lípidos en el tejido adiposo blanco [7].

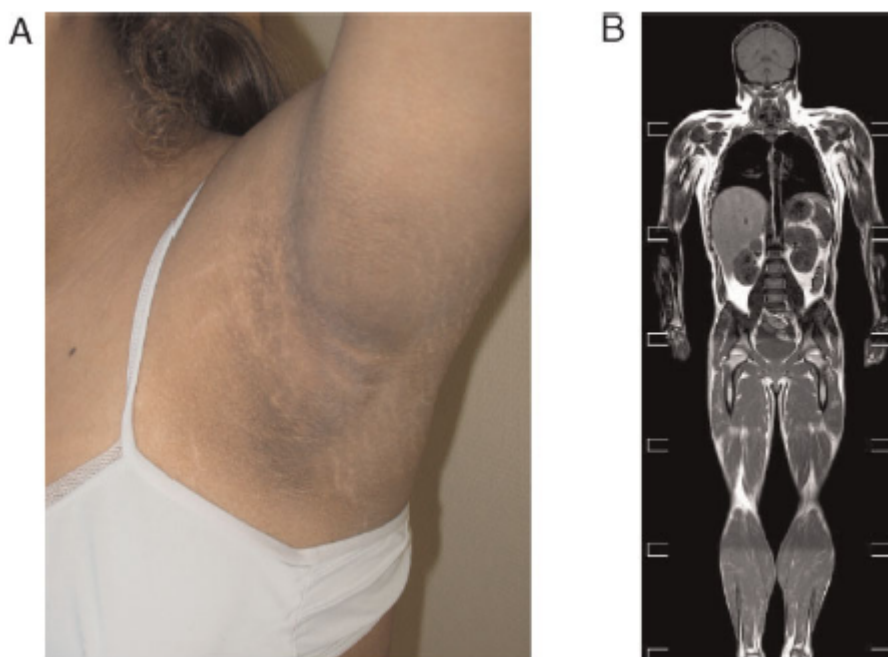


Figure 1.37: Paciente portadora de una mutación homocigótica que produce un codón de parada prematura (E186X) en el gen *CIDE*C, con lipodistrofia parcial y acantosis nigricans. A, Imagen fotográfica que muestra la acantosis nigricans en axila; B, Imagen de resonancia magnética “T1 weighted” que indica la escasa grasa subcutánea de las piernas, antebrazos, regiones glúteo-femoral y abdominal. La grasa de las axilas y el cuello está conservada. Se observa hepatomegalia debido a una severa esteatosis. También manifiesta una notable hipertrofia muscular. (Tomada de Rubio-Cabezas *et al.*, 2009 [7])

Existen muchos pacientes con fenotipo de FPL que no presentan mutaciones en ninguno de estos cinco genes (*LMNA*, *PPARG*, *AKT2*, *PLIN1* o *CIDEA*), por lo que aún estarían por identificarse nuevos genes responsables de FPL [353].

#### 1.3.2.3. Lipodistrofias familiares sistémicas

##### *1.3.2.3.A. Síndrome de SHORT*

El síndrome de SHORT es extremadamente raro y se ha descrito en aproximadamente 30 pacientes. Las principales manifestaciones clínicas son talla baja, hiperextensibilidad de las articulaciones y/o hernia inguinal, depresión ocular, anomalía de Reiger (enfermedad congénita que afecta tanto a estructuras del ojo como a otros órganos) y dentición tardía. La mayoría de los pacientes presentan lipodistrofia que afecta principalmente a la cara, las extremidades superiores y al tronco. La distribución de la pérdida de la grasa es similar a la observada en pacientes con lipodistrofia parcial adquirida. En algunos pacientes se puede hacer un diagnóstico erróneo de progeria debido a la severa pérdida de grasa que presenta en la cara. Las bases genéticas no se conocen [289].

##### *1.3.2.3.B. Lipodistrofia asociada con displasia mandibuloacral por mutaciones en ZMPSTE24 (zinc metaloproteinasa)*

La displasia mandibuloacral (MAD) es una enfermedad autosómica recesiva caracterizada por desarrollo postnatal de osteolisis que involucra a la mandíbula, clavículas y a las falanges distales. Otras características asociadas incluyen talla baja, retraso en el cierre de las suturas craneales, pigmentación moteada de la piel, hipogonadismo y pérdida de la audición neurosensorial. Estos pacientes también presentan resistencia a la insulina. La lipodistrofia es otra característica de este síndrome. Se han descrito dos variantes de MAD (tipo A y B) sobre la base del patrón de pérdida de grasa [354]. MAD tipo B está asociada con un patrón generalizado de pérdida de grasa (Figura 1.38) y se produce por mutaciones en la enzima zinc metaloproteasa (ZMPSTE24), la cual es crítica para el procesamiento proteolítico post-traducción de la prelamina A para madurar a lamina A [355].

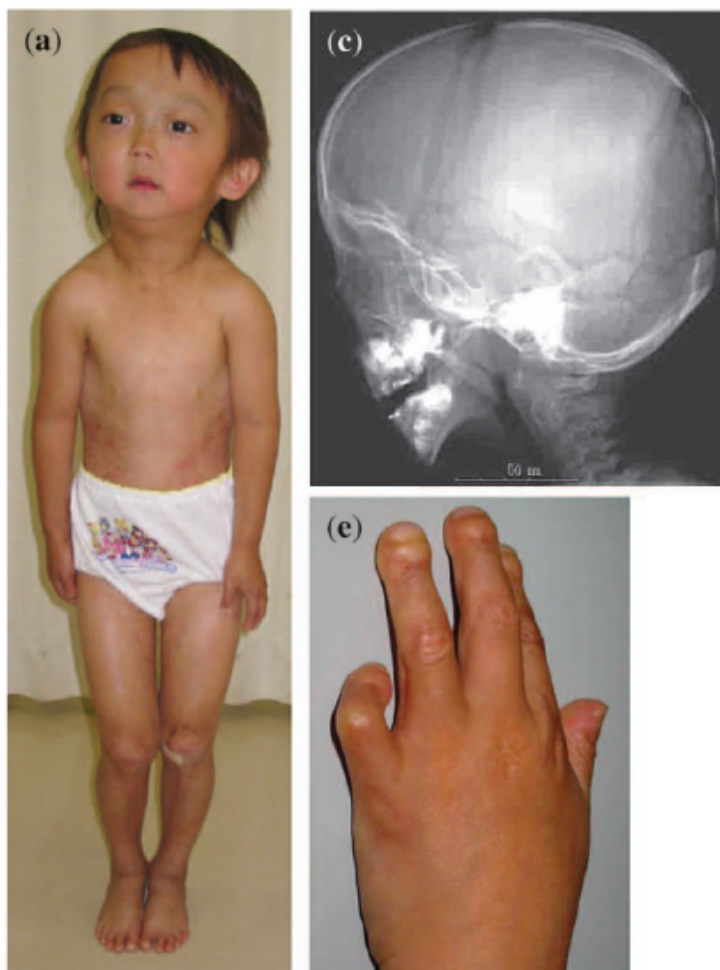


Figura 1.38: Imágenes fotográficas y radiográfica de un paciente de 7 años de edad con MAD tipo B. Vista frontal de todo el cuerpo (a), de la mano izquierda (e), radiografía de vista lateral del cráneo (c). Se nota escaso TAsc, atrofia de la piel con hiperpigmentación moteada y la punta de los dedos redondeada. Presenta también curvatura del quinto dedo, mandíbula hipoplásica. (Adaptada de: Miyoshi *et al.*, 2008 [356])

#### 1.3.2.3.C. Lipodistrofia asociada con MAD por mutaciones en LMNA

La displasia mandibuloacral, MAD, comprende también una variante tipo A asociada a mutaciones en *LMNA*. Novelli y colaboradores [357] identificaron una mutación homocigótica (Arg527His) en el gen *LMNA* en pacientes MAD con lipodistrofia parcial (patrón tipo A), en un pedigrí italiano [357]. Los sujetos heterocigóticos para esta mutación no mostraban manifestaciones fenotípicas de MAD. Este tipo de MAD se caracteriza por: retraso en el crecimiento postnatal, pérdida de TAsc en extremidades y la acumulación (normal o incrementada) de grasa en tronco, cara y cuello, anomalías cráneo-faciales, displasia mandibular y clavicular, acro-osteolisis distal de las falanges, agarrotamiento de las articulaciones, hiperpigmentación moteada de la piel (Figura 1.39) y resistencia a la insulina.

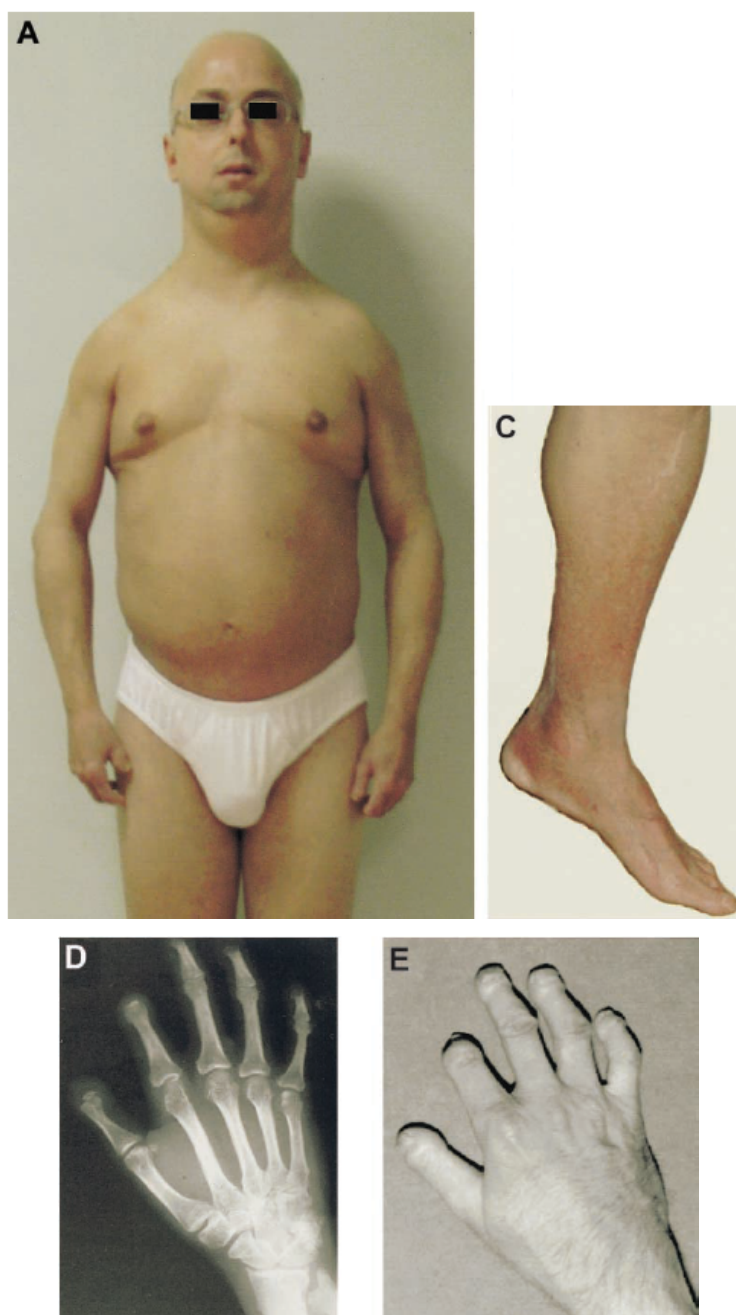


Figura 1.39: Características clínicas de MAD tipo A. A, Vista frontal de un paciente que muestra alopecia, micrognatia, hombros caídos. C, Lipodistrofia, hiperpigmentación y acro-osteolisis en extremidades inferiores. D, imagen radiográfica que muestra notable osteolisis de falanges distales. E, acortamiento de las falanges distales. A y C, lipodistrofia en extremidades superiores e inferiores. (Adaptada de: Novelli *et al.*, 2002 [357])

#### 1.3.2.3.D. Lipodistrofia asociada con el síndrome progeroide neonatal

El síndrome progeroide neonatal, también conocido como síndrome de Wiedemann-Rautenstrauch, ha sido descrito sólo en unos 25 casos [289]. Las características clínicas son evidentes desde el nacimiento e incluyen una cara triangular, con aspecto de envejecimiento, pseudohidrocefalia con retraso en el cierre de las fontanelas, lipodistrofia generalizada y

alteraciones del metabolismo lipídico. Aunque, las regiones sacra y glútea están exentas de pérdida de grasa [289] (Figura 1.40). La mayoría de estos pacientes mueren antes de los 7 meses de edad. Las bases genéticas aún no se conocen.

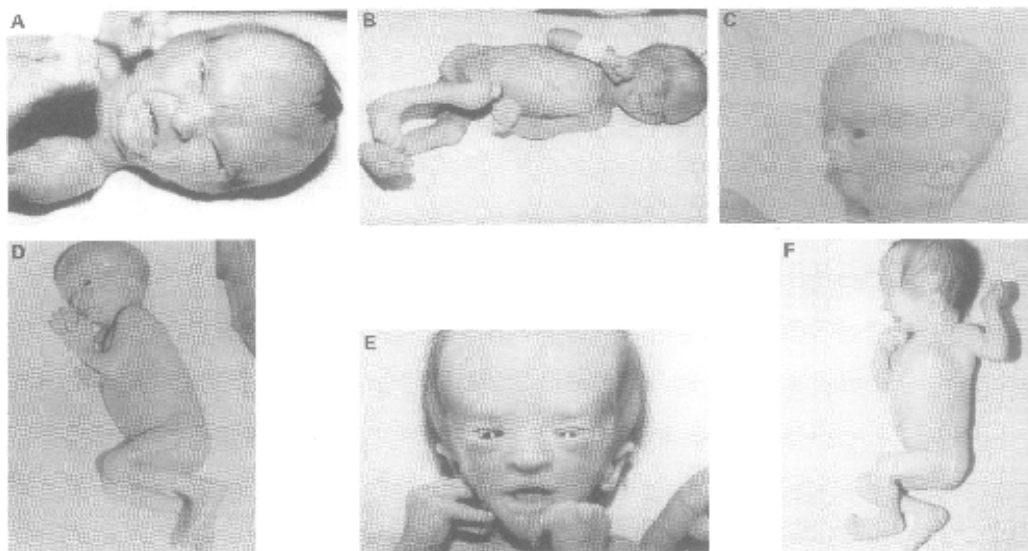


Figura 1.40: Imágenes fotográficas de tres pacientes con el síndrome progeroide neonatal de Wiedemann-Rautenstrauch. A,B: Caso 1, al nacer; C, D: Case 2, con 5 meses de edad; E, F: caso 3, con 8 días de nacido. (Tomada de: Arboleda *et al.*, 1997) [358]

#### 1.3.2.3.E. Progeria de Hutchinson-Gilford

La progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS) es un síndrome raro de envejecimiento prematuro que se produce debido a mutaciones en el gen *LMNA* [359]. Los niños con HGPS se ven envejecidos y muestran retraso del crecimiento, micrognatia, escasa grasa subcutánea, alopecia, pigmentación moteada de la piel, lesiones osteogénicas en huesos y osteoporosis (Figura 1.41). Las mutaciones en *LMNA* que causan HGPS interfieren en la conversión de la farnesil-prelamina A a lamina A madura [359] [360]. La mutación más común es una mutación puntual en el exón 11 que no modifica al aminoácido (G608G) pero sí altera el sitio de *splicing*, provocando la delección de 50 aminoácidos cerca del carboxilo terminal de la prelamina A [359] [360]. La delección deja intacto el motivo estructural CaaX, por lo que la prelamina mutada, llamada progerina, es farnesilada y carboximetilada [361]. Sin embargo, el sitio para el corte endoproteolítico final de ZMPSTE24 sí queda eliminado por la delección [362], por lo que esta prelamina A mutada permanece farnesilada [231] y mayormente anclada en la membrana nuclear [363].

Numerosos estudios han tratado de entender por qué la progerina o la prelamina A farnesilada es tóxica para la célula. Algunos datos dan idea del importante papel de la lamina A/C en el



reclutamiento de los factores de reparación del ADN [213]. Se sugiere entonces que cuando esta proteína está alterada se produce una inestabilidad genómica y activación de p53 que conduce a la senescencia celular y al envejecimiento acelerado. Estudios recientes muestran que la progerina podría afectar a las células madre mesenquimales provocando una diferenciación alterada del linaje celular originado por estas células [364] que incluye hueso, músculo, tejido adiposo, piel, todos ellos tejidos que fundamentalmente se ven afectados en las laminopatías.



Figure 1.41. Características físicas de diferentes niños con el síndrome progeroide de Hutchinson-Gilford. A, baja estatura en un paciente de 21 meses de edad. B, alopecia en un paciente a los 4 años de edad. C, envejecimiento progresivo en un paciente con 7 años de edad. D, flebomegalia y contractura de la articulación de la rodilla con limitación en la extensión. E, dedos nudosos. F, contracturas en las articulaciones de las falanges. G, irregularidades en la piel de la pierna izquierda. H, áreas de la piel hipopigmentada. I, distensión abdominal, hiperpigmentación reticular de la piel intercalada con hipopigmentación. J, cianosis circumoral. (Tomada de Merideth *et al.*, 2008 [365])

#### 1.3.2.3.F. Síndrome de Werner

Este cuadro se ha atribuido a mutaciones en homocigosis en el gen RECQL2 (MIM 604611), que codifica para una DNA helicasa. Estos pacientes presentan talla baja, fenotipo progeroide de inicio tardío, lipodistrofia que afecta al tronco, cara y extremidades, resistencia a la insulina, osteoporosis, cataratas, hipogonadismo, alteraciones cutáneas, calcificaciones arteriales y muerte prematura por enfermedad cardiovascular o cáncer [366] (Figura 1.42).

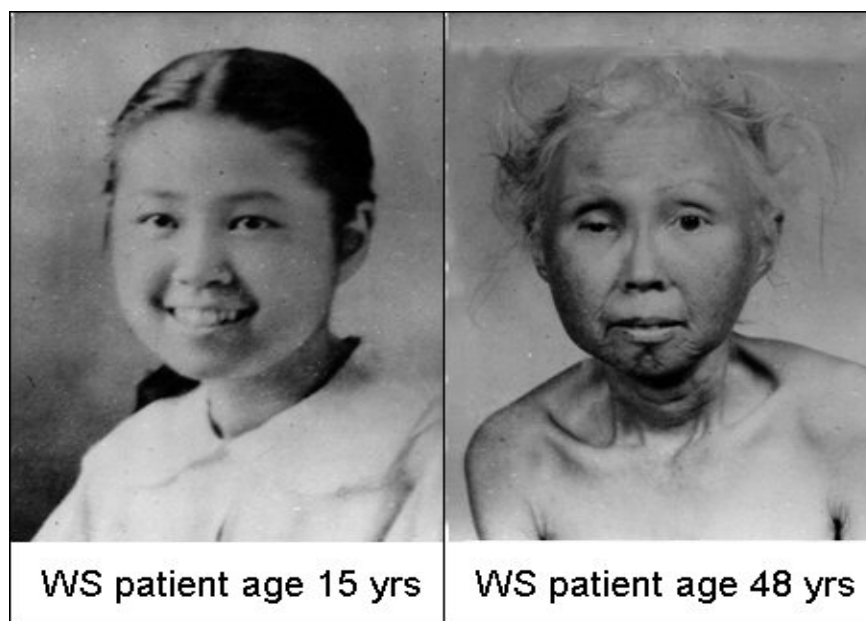


Figura 1.42: Imagen que muestra los cambios degenerativos en la cara de una paciente japonesa-estadounidense con síndrome de Werner, después de la adolescencia. (Tomada de: [http://www.lookfordiagnosis.com/mesh\\_info.php?term=Werner+Syndrome&lang=1](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Werner+Syndrome&lang=1))

#### 1.3.2.3.G. Síndromes progeroides atípicos

El fenotipo de los síndromes progeroides atípicos no ha sido bien caracterizado. Los pacientes descritos tienen características progeroides variables como: baja estatura, nariz en forma de pico, encanecimiento precoz, alopecia parcial, voz aguda, atrofia de la piel en manos y pies, además de presentar diabetes, lipodistrofia generalizada, pigmentación de la piel e hipoplasia mandibular (Figuras 1.43 y 1.44) [367].

La causa de estos síndromes son mutaciones en el gen *LMNA*. La patogénesis de las manifestaciones clínicas en estos pacientes no parece estar relacionada con la acumulación de la forma farnesilada de la prelamina A mutada [367].



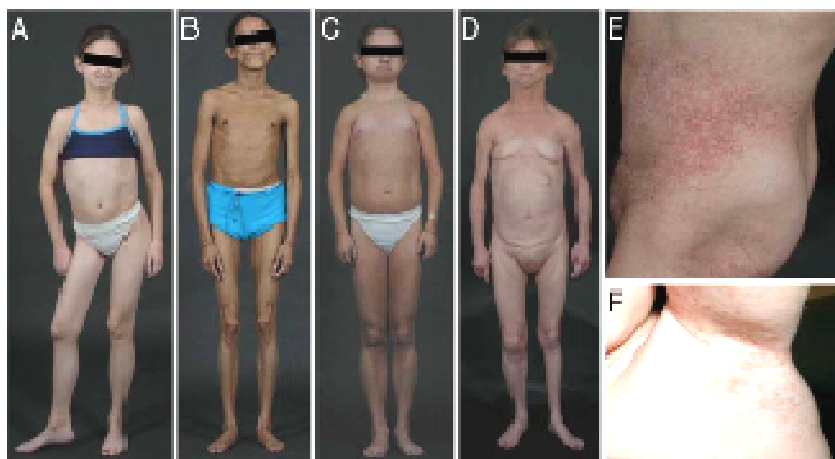


Figura 1.43: Pacientes con síndromes progeroides atípicos por diferentes mutaciones en el gen *LMNA*. A, niña de 13 años de edad con una enfermedad autoinmune, espondilolistesis, necrosis vascular de la articulación de la cadera derecha, displasia de válvulas cardíacas, alopecia y la mutación E159K. B, mujer de 27 años de edad con lipodistrofia generalizada, diabetes, hipertrigliceridemia y la mutación D136H. C, una adolescente de 16 de edad con diabetes, lipodistrofia parcial y la mutación C588R. D, mujer de 51 años de edad con lipodistrofia parcial, diabetes, anomalías valvulares, alteraciones vasculares de la piel (E), y la mutación P4R. F, niño de 7 años de edad con efélides en axilas, y la mutación C588R. (Tomada de Garg *et al.*, 2009.[367]).



Figura 1.44: Niño de 11 años con un síndrome progeroide atípico debido a la mutación *de novo* Thr10Ile en el gen *LMNA* en heterozigosis. Presenta lipodistrofia generalizada que afecta a palmas y plantas, miocardiopatía dilatada, diabetes mellitus, hipertrigliceridemia, esteatohepatitis no alcohólica, máculas leuco-melanodérmicas, encanecimiento precoz, contracturas articulares, osteoporosis infantil e hipoleptinemia. (Cortesía del Prof. Araújo-Vilar, Facultad de Medicina de Santiago de Compostela)

### 1.3.2.3.H. Síndrome progeroide de Néstor-Guillermo (NGPS), por mutación en *BANF1*

Muy recientemente se ha descrito un síndrome progeroide que fenocopia características de síndromes progeroides clásicos como la progeria de Hutchinson-Gilford y la displasia mandíbuloacral: apariencia de envejecimiento, retraso del crecimiento, disminución de la grasa subcutánea, miembros delgados y rigidez de las articulaciones. Sin embargo, en el síndrome progeroide de Néstor-Guillermo (NGPS) también se manifiestan características distintivas que incluyen la ausencia de patología cardiovascular y alteraciones metabólicas, ausencia de mutaciones en *LMNA* y *ZMPSTE24*, y una esperanza de vida relativamente larga de los individuos afectados, entre otras (Figura 1.45). Estos individuos presentan lipoatrofia generalizada, severa osteoporosis y notable osteolisis. En los pacientes con NGPS se identificó una mutación homocigótica en *BANF1* (c.34G>A, p.Ala12Thr), gen que codifica para la proteína “barrier-to-autointegration factor 1” (BAF), como la responsable de este síndrome. Se observó una significativa reducción de la expresión de la proteína BAF y notables alteraciones nucleares en los fibroblastos de estos pacientes [228] [368].



Figura 1.45: Síndrome progeroide de Néstor-Guillermo, condición de envejecimiento prematuro con inicio temprano y desarrollo crónico causada por mutaciones en el gen *BANF1*. Imágenes del curso de vida en paralelo de los dos pacientes diagnosticados. Paciente 1 (A-E) y paciente 2 (F-J). (Tomada de Cabanillas *et al.*, 2011 [368])

#### 1.3.2.4. Modelos animales de lipodistrofia

Hasta la fecha se han desarrollado y caracterizado numerosos modelos de ratón para el estudio de la lipodistrofia y sus consecuencias. Modelos en los cuales se produce lipodistrofia de modo esperado o casual, por mutación o alteración de la expresión de genes endógenos.

Entre otros, se incluyen:

- El modelo de ratones aP2-nSrebp1c (Sr), que expresa una proteína Srebp-1c truncada, a partir de un Srebp-1c transgénico constitutivamente activo en adipocitos, en el que el fenotipo lipodistrófico no era esperado ni se explican los mecanismos por los que se desarrolla. Los ratones aP2-SREBP-1c muestran <70% de reducción de la masa de TAB, hígado graso, niveles de leptina reducidos y glucosa, insulina y triglicéridos elevados [369].
- Ppargldi, un modelo de ratones con un alelo de PPAR $\gamma$  creado por manipulación genética que confiere una lipodistrofia condicional dominante [370]. Los fibroblastos de embrión de ratones transgénicos tipo Ppargldi o del aP2-nSrebp1c (Sr), fenotípicamente similares, desarrollan una adipogénesis normal, lo que sugiere que en ninguno de estos modelos animales se desarrolla lipodistrofia debido a una defectuosa diferenciación defectuosa de los adipocitos. Sin embargo, a nivel molecular, el tejido adiposo de ambos modelos presenta considerables alteraciones en la expresión génica, característica de la grasa lipodistrófica [370].
- Un nuevo modelo de ratón transgénico que expresa específicamente, en adipocitos, la lamina A o la lamina C humana portando la mutación R482Q, común en humanos con FPLD2. El fenotipo observado en este ratón transgénico es muy similar a las características de la FPLD en humanos, incluyendo la escasa acumulación de grasa, resistencia a la insulina e hígado graso. A semejanza de la enfermedad en humanos, el ratón transgénico FPLD parece desarrollarse normalmente, pero después de varias semanas son incapaces de acumular grasa en la misma medida en que lo hacen los ratones controles con el fenotipo *wild type*. Este grupo de investigación, en el estudio del ratón lamina R482Q, encontró que el mecanismo clave que contribuye a la falta de acumulación de grasa no involucra una pérdida de grasa, sino una aparente incapacidad del tejido adiposo para regenerarse a si mismo. Específicamente, los preadipocitos son incapaces de diferenciarse en adipocitos maduros y completamente funcionales [371].

- Los ratones *Cebpa knockout* desarrollan hipoglucemia y mueren poco tiempo después de su nacimiento debido a un severo defecto en la gluconeogénesis [372]. En estos ratones el tejido adiposo no es capaz de acumular lípidos, ni siquiera por expresión hepática transgénica de C/EBP $\alpha$  [373].
- El ratón *Zmpste24*  $-/-$  ha resultado un modelo valioso para comprender las consecuencias de la acumulación de la prelamina A parcialmente procesada. La prelamina A es isoprenilada y carboximetilada, pero no se produce el subsecuente corte de péptidos aaX y del grupo isopreno. Los ratones *Zmpste24*  $-/-$  muestran muchas características de progeria, incluyendo retraso en el crecimiento, alopecia, micrognatia, lesiones osteolíticas y osteoporosis. Además, la deficiencia de *Zmpste24* está claramente ligada a la acumulación de esta prelamina A parcialmente procesada entre la envoltura nuclear [207] [374].
- “PPAR $\gamma$  adiposeKO” es un modelo de ratón, en el que se elimina PPARgamma específicamente del tejido adiposo. Estos animales presentan notables anormalidades en la formación y función del tejido adiposo blanco y pardo. Cuando son alimentados con una dieta rica en grasa experimentan una disminución de la ganancia de peso a pesar de la hiperfagia y disminución de las concentraciones séricas de leptina y adiponectina. La caracterización *in vivo* de la dinámica de la glucosa apunta a que se produce un reajuste en el metabolismo hepático de la glucosa que evita la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en grasa. Esto sugiere una inducción compensatoria de PPAR $\gamma$  hepático que podría estimular un incremento de la utilización de glucosa en el hígado [375].
- Existe también un modelo de ratón que se produjo espontáneamente, llamado mutante fld (“fatty liver dystrophy”), a partir del cual se aisló por primera vez el gen fld o *Lpin1* [376] [377]. Estos animales presentan lipodistrofia, resistencia a la insulina, neuropatía periférica y esteatosis hepática neonatal. Péterfy y colaboradores identificaron la deficiencia de lipin-1 (proteína nuclear codificada por *Lpin1*) como la causa de estas alteraciones [378]. La secuenciación del ADNc de *Lpin1* ADNc y ADN genómico procedente de tejidos de ratones fld, permitió detectar una mutación puntual que provoca la sustitución Gly84Arg, siendo el residuo Gly84 altamente conservado en secuencias homólogas de diversos organismos, incluyendo la de humano. Se observó además que esta mutación provoca un reordenamiento del gen y la carencia de ARNm de lipin-1

mRNA [378]. De modo análogo a lo observado en humanos con FPL, los ratones fld presentan niveles de leptina en plasma reducidos. Esto sugiere que el primer defecto en los ratones fld es la alteración en el desarrollo del tejido adiposo, con otras características fenotípicas (esteatosis hepática, hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina) que se producen como manifestaciones secundarias de la mutación [378].

- Recientemente, fue creado el primer modelo de ratón *BSCL2 knockout*, seipin (-/-) [379]. Los ratones seipin (-/-), son viables y tienen un peso normal, pero presentan una masa de tejido adiposo significativamente reducida, estaetosis hepática, intolerancia a la glucosa e hiperinsulinemia. Los niveles de leptina y adiponectina están significativamente reducidos. Sorprendentemente, aunque en los humanos con lipodistrofia de tipo BSCL es común la hipertrigliceridemia, ésta no se observó en los ratones seipin (-/-). Los hallazgos obtenidos con este modelo sugieren un posible papel de autonomía de tejido de la seipina en el almacenamiento de lípidos en el hígado.

### 1.3.3. LAMINOPATIAS, POSIBLES MECANISMOS

La familia de enfermedades que se originan por las más de 100 mutaciones descritas hasta la fecha en las laminas nucleares se denominan laminopatías. Además de la FPLD2, las mutaciones en *LMNA* pueden causar diferentes enfermedades como la progeria Hutchinson-Gilford (HGPS; OMIM 176670) [360] [359], la displasia mandibuloacral (MAD; OMIM 248370) [357], la distrofia muscular de Emery-Dreifuss (EDMD; OMIM 181350) [380], la distrofia muscular “limb-girdle” (LGMD1B; OMIM 159001) [381], miocardiopatías dilatadas y defectos de la conducción cardíaca (OMIM 115200) [382], enfermedad de “Charcot-Marie-Tooth” tipo 2 (OMIM 605588) [383], síndrome de Werner atípico [320]; así como varios síndromes que se solapan [384] (Figura 1.37). Así, por ejemplo, se ha descrito que la mutación, en homocigosis, *LMNA* c.1411C>T, p.R471C, se asocia con un fenotipo que combina displasia mandíbuloacral (MAD), progeria y rigidez de la columna vertebral por distrofia muscular [385]. En otra mutación de sentido equivocado, en heterocigosis, *LMNA* c.799 T/C, p.Y267H, asociada con alteraciones cardíacas, se ha visto que puede dar lugar a un fenotipo combinado con implicaciones del músculo esquelético, similares al fenotipo de la distrofia muscular de Emery Dreifuss [386]. Muschke y colaboradores describieron que la mutación heterocigótica *LMNA* c.1411C>G, p.R471G estaba asociada a un síndrome que

comprende lipodistrofia parcial, diabetes insulino-resistente, acantosis nigricans, esteatosis hepática, distrofia muscular y contracturas [387].

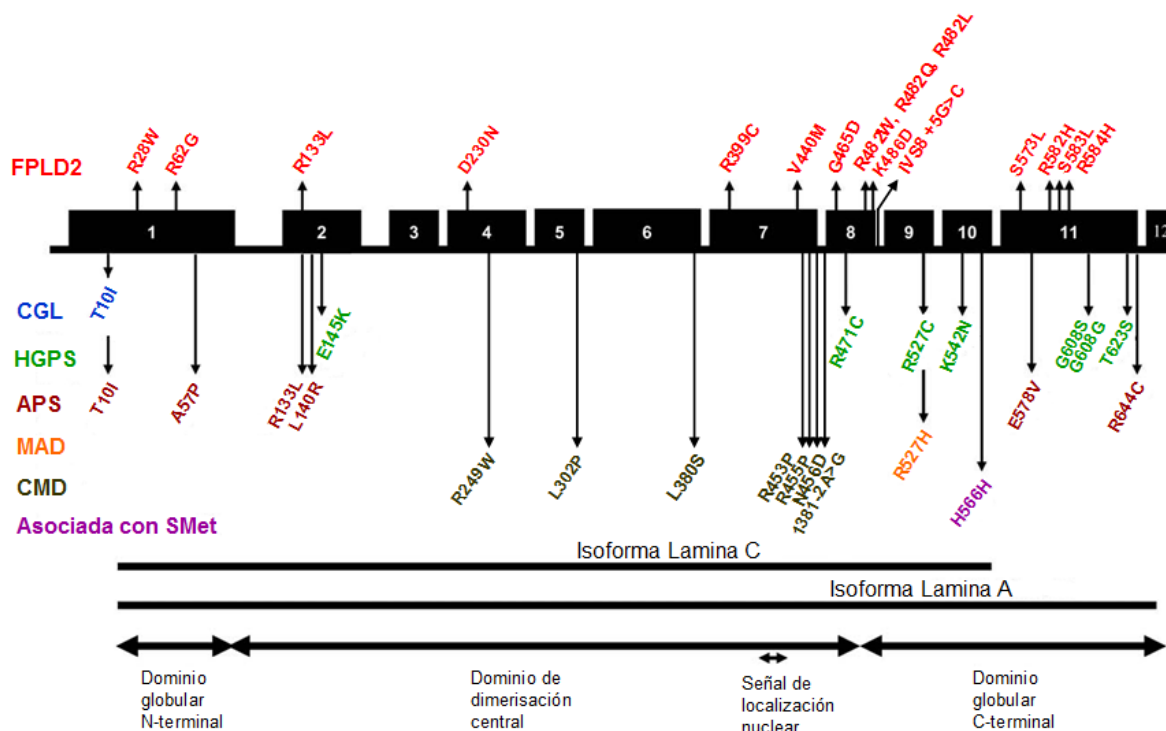


Figura 1.37: Laminopatías asociadas con el gen LMNA. Localización de mutaciones asociadas a enfermedad (enumeradas de acuerdo al residuo aminoacídico afectado). FPLD2: lipodistrofia parcial familiar tipo Dunnigan; CGL: lipodistrofia congénita generalizada; HGPS: síndrome progeroide de Hutchinson Gilford; APS: síndrome progeroide atípico; MAD: displasia mandíbuloacral; CMD: distrofia muscular congénita; SMet: síndrome metabólico (H566H polimorfismo sinónimo común asociado con el SMet). Isoformas lamina A y C, sus dominios funcionales. (Modificada de: Lanktree *et al.*, 2007 [388])

La mayor parte de la región anterior a la señal de localización nuclear (NLS) alberga el dominio conservado “rod” que es común a las proteínas del filamento intermedio y constituye un pilar estructural esencial para la estructura y la integridad del núcleoesqueleto [389]. Sin embargo, la región posterior a la NLS podría interactuar más estrechamente con elementos que no son del núcleoesqueleto, como el ADN, la cromatina y/o factores de transcripción [389]. Esta distinción podría ser importante teniendo en cuenta que estudios *in vivo* realizados en modelos animales de ratón (mutantes inducidos) sugieren que las mutaciones en *LMNA* pueden afectar a la estructura nuclear o a las interacciones con factores de transcripción, o a ambos [390].

La mayoría de las mutaciones en *LMNA* que originan FPLD2 son mutaciones de sentido equivocado dentro del extremo terminal 3' del gen. Los exones 11 y 12 son específicos de la

isoforma lamina A, por lo que las mutaciones en estos exones implican sólo a la isoforma lamina A en FPLD2 [391] .

Muchas de las mutaciones de *LMNA* que originan FPLD2 se localizan en el dominio de unión al ADN, en el extremo C-terminal [193] [391]. Esto conduce a suponer que el mecanismo molecular de la FPLD2 y también de las otras laminopatías que se producen por mutaciones dentro o cerca de este dominio, está relacionado con interacciones alteradas de factores de transcripción o de otras moléculas de unión al ADN [391].

Stierlé y colaboradores, mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y EMSA, observaron que dos regiones del péptido de lamina participan en la unión al ADN: una parte amino-terminal no estructurada que contiene a la señal de localización nuclear y una región con gran carga positiva centrada alrededor del aminoácido R482 en la superficie del dominio tipo Ig. Estos autores observaron además que las mutaciones *LMNA*-R482W/Q causantes de FPLD2 reducen la afinidad de la unión lamina A/ADN [193]. Concluyeron entonces que el extremo carboxilo-terminal de las laminas A y C se une al ADN; y sugirieron que alteraciones en las interacciones lamina-ADN podrían jugar un papel en la fisiopatología de algunas enfermedades ligadas a la lamina.

Los mecanismos por los cuales una mutación en *LMNA* conduce específicamente a una distrofia de las células adiposas no están completamente definidos. No está claro cuál de las múltiples funciones normales de la lámina nuclear, como el mantenimiento de la forma y estructura nuclear, la regulación transcripcional, el posicionamiento y función de los poros nucleares y la organización de la cromatina [392], se ve afectada por las mutaciones de FPLD en *LMNA*. Tampoco se conoce si existe un único mecanismo responsable de la patogenicidad de todas las laminopatías.

Existen muchas hipótesis que intentan explicar cómo las mutaciones en *LMNA* causan laminopatías a nivel celular y por qué diferentes mutaciones presentan una amplia variedad de fenotipos. Éstas incluyen ideas alrededor del papel de las laminas y las NETs en el mantenimiento de la integridad mecánica de las células (hipótesis estructural), las funciones emergentes de las laminas en la diferenciación de células madre adultas y el envejecimiento celular (teoría de la proliferación celular). Aunque cada hipótesis parezca ser independiente y pueda explicar diferentes aspectos de cada enfermedad o enfermedades diferentes, estas teorías no son excluyentes si se tiene en cuenta que todas las funciones de las laminas

dependen de su capacidad para anclar complejos multiproteicos a la envoltura nuclear o a sitios dentro del nucleoplasma.

La hipótesis estructural propone que una de las funciones más importantes de las laminas es mantener la integridad estructural de las células, particularmente de células sometidas a carga mecánica.

Se supone que las mutaciones de sentido equivocado que generan laminopatías causan alteraciones en el plegamiento de la lamina A/C o fallo de la dimerización y ensamblaje de la lamina, lo cual debe originar anormalidades estructurales y/o fragilidad del núcleo [148] [393]. La pérdida de función de la lamina o de las NETs como resultado de una mutación conduce al debilitamiento de la célula, y éste a su vez conduce a la muerte celular cuando están sometidas a estrés [394]. Este modelo estructural fue fundamentado al demostrarse que fibroblastos de ratones *knockout* para *LMNA* aumentaron la sensibilidad al estrés mecánico [395]. Se dan respuestas diferenciales al estrés mecánico dependiendo de las mutaciones, y los distintos tipos de células también generan variabilidad fenotípica.

Además, se ha visto de modo regular un daño mecánico de la envoltura nuclear en células obtenidas de pacientes con laminopatías, que se manifiesta como anormalidades en la forma de la envoltura nuclear (llamadas herniaciones) o por la aparición de fisuras. Se ha observado que estas anormalidades se acumulan con la edad [148]. Probablemente dichas anormalidades se generan porque las laminas mutadas forman asociaciones inestables con la lámina [148].

En la mutación común R482W que origina la FPLD2 clásica no se han observado cambios estructurales muy severos, pero la eliminación de la carga positiva de esta particular región altera las características de unión de estas moléculas al ADN [193].

Sin embargo, este modelo estructural no explica del todo la heterogeneidad tejido-específica y los frecuentes fenotipos no solapados causados por mutaciones de sentido equivocado en *LMNA*.

La segunda hipótesis, no excluyente, para la patogénesis de las laminopatías es que las laminas regulan la expresión génica y/u otras actividades del núcleo. La membrana nuclear, además de su función estructural, probablemente contribuye a los patrones globales de expresión génica. Como la heterocromatina es por lo general transcripcionalmente silente, cambios en la estructura de la heterocromatina podían alterar los patrones de expresión génica, quizás únicos para cada mutación de *LMNA*. Cambios en la estructura de la lámina podrían provocar reorganización de la heterocromatina [396]. Se ha visto desorganización y



pérdida de heterocromatina en células HGPS [397] [232] y en MAD [398], y que el restablecimiento de la heterocromatina hace que se recupere la forma del núcleo [397].

Además, las laminas nucleares afectan directamente la expresión génica. Reguladores transcripcionales como el producto del gen del retinoblastoma (pRB), interactúa con la lamina A *in vitro* y están estrechamente asociados con la matriz nuclear en las células [399]. Al introducir una selección de mutantes de *LMNA* en células de ratón *Lmna*<sup>-/-</sup>, se observó que no todos los mutantes fueron capaces de restablecer la función del ciclo celular, lo cual se atribuye a la interacción lamina A-pRB [400].

La lamina A también interactúa con el factor de transcripción SREBP1 que está involucrado en la diferenciación de adipocitos (ver sección 1.1.6.1) [233]; de hecho, esta interacción podría ser una clave determinante en el desarrollo de la lipodistrofia. La unión de lamina A y SREBP1 se reduce notablemente por las mutaciones que originan FPLD [233]. La regulación de estos factores de transcripción podría además diferir dependiendo de la posición de la mutación en *LMNA*.

En 2005, Capanni y colaboradores, al estudiar el procesamiento de la lamina A/C en tres laminopatías caracterizadas por fenotipos lipodistróficos: FPLD2, MAD y el síndrome de Werner atípico, encontraron que el precursor de la lamina A se acumulaba específicamente en las células lipodistróficas. La prelamina A se localizó en la envoltura nuclear y co-localizó con el factor de transcripción SREBP1. Estos autores demostraron, a través de experimentos de co-inmunoprecipitación, que se produce una interacción entre SREBP1 y prelamina A *in vivo*. Dicha interacción fue detectada tanto en fibroblastos de pacientes como en fibroblastos de controles en los que se indujo acumulación de prelamina A a través de inhibidores de la farnesilación. Sin embargo, no se observó interacción entre SREBP1 y la lamina A o C maduras *in vivo* al estudiar fibroblastos en cultivo. Además, al inducir la acumulación de prelamina A en preadipocitos murinos 3T3-L1 se vio que la prelamina A secuestraba a SREBP1 en la periferia nuclear, por lo que disminuyó la cantidad de SREBP1 activo que normalmente activa a PPAR $\gamma$ , afectando así la diferenciación de los preadipocitos [239].

La tercera hipótesis se basa en el efecto sobre la proliferación celular. En 2008, Naetar y colaboradores [401], demostraron que la pérdida de la proteína LAP2 $\alpha$  causa relocalización de las laminas tipo A nucleoplasmáticas hacia la envoltura nuclear afectando la función de pRb. Esto provoca una ineficiente parada del ciclo celular en cultivos de fibroblastos con gran densidad o hiperproliferación de células epidérmicas y células progenitoras eritroides *in vivo*,

que provoca hiperplasia del tejido. Estos datos sugieren que la focalización de las laminas tipo A en el nucleoplasma, mediada por LAP2 $\alpha$ , regula la actividad de pRb en células progenitoras jóvenes para mantener un adecuado balance entre la proliferación y la diferenciación. Mientras que las células madre multipotentes, que expresan poca LAP2 $\alpha$  y no expresan lamina A/C [402] [403], no se ven afectadas por la pérdida de LAP2 $\alpha$ . Este mecanismo podría ser de gran relevancia para aquellas células madre comprometidas con un linaje, las cuales empiezan a expresar lamina A/C y poseen altos niveles de LAP2 $\alpha$ . Tales hallazgos sugieren también que las mutaciones en LMNA o LAP2 podrían afectar a las células progenitoras jóvenes en la regeneración de tejido en las laminopatías en humanos [401].

Se ha observado que en la distrofia muscular de Emery-Dreifuss-autosómica dominante las mutaciones promueven apoptosis [404]. Este hallazgo ha dado lugar a una hipótesis más general en la que muchas de las características de las laminopatías se explicarían por una regulación anormal de la proliferación celular y la muerte celular.

Los fibroblastos de pacientes con HGPS presentan índices de proliferación celular anormalmente altos en pases tempranos pero aumenta la velocidad de apoptosis. Sin embargo, este fenotipo pro-apoptótico y de rápido crecimiento da lugar a senescencia celular prematura en número de pases superiores [405]. Los fibroblastos de piel de un modelo de ratón progerico [406] también desarrollan senescencia celular prematura.

Teniendo en cuenta estos hallazgos, se supone que si los fibroblastos de piel representan modelos para la capacidad proliferativa de células madre adultas, una explicación para los fenotipos de envejecimiento asociado con las laminopatías más severas es que las laminas mutadas imponen un fenotipo senescente en células madre adultas que impide su amplificación y por lo tanto limita su capacidad de regeneración [148].

La cuarta hipótesis plantea que la acumulación de prelamina A parcialmente procesada en la envoltura nuclear es tóxica en algunas células. En las laminopatías más graves se acumulan formas de prelamina A entre la envoltura nuclear, ya sea por la activación de un sitio crítico de *splicing*, generando una forma truncada de prelamina A (llamada progerina) que carece del sitio de corte endoproteolítico necesario para la maduración de la lamina A [359] o por deficiencia de FACE-1/Zmpste24, la cual origina acumulación de un producto parcialmente procesado de prelamina A en la envoltura nuclear [407] [148].

Se ha demostrado que las mutaciones en LMNA que originan la progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS) [359] [360] afectan la eliminación del grupo farnesilo de la prelamina A, la

cual se convierte en una toxina intracelular [359, 360]. Fong y colaboradores, en 2006 encontraron una mejoría en ratones deficientes de *Zmpste24*, un modelo murino de progeria, cuando fueron tratados con un inhibidor de la farnesil transferasa [408].

En un estudio en el que se cruzaron ratones *Zmpste24*  $-/-$  con ratones *Lmna*  $+/-$ , se obtuvieron ratones *Zmpste24*  $-/-$  *Lmna*  $+/-$  que llamativamente fueron fenotípicamente normales. Ello sugiere que la reducción de un 50% en el nivel de expresión de la prelamina A parcialmente procesada es suficiente para proteger de la enfermedad [409].

Otros estudios demostraron que sólo la prelamina A parcialmente procesada es tóxica para las células, mientras que la prelamina A sin procesamiento alguno (que no es isoprenilada, impidiendo posteriores pasos de procesamiento) parece ser menos dañina para las células. La prelamina A no procesada, en general, se acumula en agregados intranucleares y aparentemente no interfiere con las laminas normales en la formación de la lámina. Sin embargo, la prelamina A parcialmente procesada de células *Zmpste24*  $-/-$  se acumula en la lámina nuclear, interfiriendo con la formación normal del polímero de la lámina, causando, entre otras, evaginaciones nucleares. Cuando estas células son tratadas con inhibidores de la farnesiltransferasa (FTI), que impiden el primer paso del procesamiento, se observa una normalización de la forma del núcleo [410]. Unos resultados similares se observaron en cultivos de fibroblastos de pacientes con HGPS tratados con FTI se observaron resultados similares [410]. También en un modelo de ratón en el que se simula HGPS, las células afectadas mejoran la forma del núcleo al ser tratadas con FTI, y los ratones tratados con FTI mostraron una mejoría en el peso corporal, en la fortaleza de sus extremidades, en la integridad de los huesos, y se prolongó su supervivencia [408].

El fenotipo de envejecimiento en células que acumulan prelamina A se explica por una defectuosa reparación del ADN y activación de la señalización de p53, a partir de los siguientes hallazgos:

Fibroblastos y células de médula ósea de ratones *Zmpste24*  $-/-$ , así como de fibroblastos HGPS muestran un incremento en los niveles de aneuploidía y daño del ADN y mayor sensibilidad a los agentes que dañan el ADN, comparados con los controles *wild type*.

El incremento de la sensibilidad a agentes que dañan el ADN se correlaciona con un fallo para reclutar a la proteína 1 de unión a p53 y RAD51 a sitios de lesiones en el ADN, provocando una perturbación en la rutas de respuesta a daños en el ADN [411].

La grandes alteraciones que sufre la cromatina periférica en los ratones *Zmpste24*  $-/-$  podría explicar por qué la reparación del ADN es tardía [411]. Resulta llamativo que mientras las rutas de respuesta a daño del ADN son defectuosas, la señalización de p53 parece estar incrementada, y si bien los genes diana de p53 están regulados positivamente de modo significativo en células y tejido *Zmpste24*  $-/-$ , la respuesta es anulada en los ratones *Zmpste24*  $-/-$  *Lmna*  $+/-$  [412].

Entonces, mientras que la respuesta inmediata a agentes que causan daños al ADN es defectuosa, parece que la entrada a un programa de senescencia mediado por p53, podría estar promovida por la presencia de prelamina A, y por lo tanto ésta podría ser la base de la toxicidad de la prelamina A.

Por otra parte, se sabe que las laminas tipo A y las proteínas asociadas están comprometidas en una amplia variedad de interacciones intermoleculares que afectan las rutas de transducción de señales. Numerosos estudios implican a proteínas de la envoltura nuclear como reguladores de la actividad y/o disponibilidad de componentes de las cascadas de señalización MAPK, Wnt-  $\beta$ -catenina, TGF- $\beta$  y Notch. Existen evidencias de que la señalización mediante estas rutas es defectuosa en varias laminopatías y que podría contribuir a la etiopatogenia de estas enfermedades [413].

Wnts son lipoproteínas (secretadas) de señalización que están implicadas en muchos aspectos del desarrollo embrionario y en la auto-renovación homeostática en los tejidos adultos [414]. Un efector clave de Wnt es la  $\beta$ -catenina. En ausencia de Wnts, la  $\beta$ -catenina citoplasmática sufre degradación proteasomal. En cambio, cuando se une a Wnt, la  $\beta$ -catenina se acumula en el citoplasma y es translocada al núcleo donde se une a los factores de transcripción TCF (factor de las células T) y Lef1 (potenciador del factor linfocitario I) e induce la expresión de los genes diana.

Existen evidencias de que la ruta de Wnt-  $\beta$ -catenina está regulada por la interacción con emerina. La interacción de  $\beta$ -catenina con emerina podría inhibir la transcripción dependiente de Wnt-  $\beta$ -catenina -TCF por acceso restringido de  $\beta$ -catenina al núcleo. Se plantea que la interacción entre Wnt -  $\beta$ -catenina, emerina y PPAR $\gamma$  podría estar implicada en la aparición de alteraciones en el tejido adiposo en algunas laminopatías, como la lipodistrofia parcial familiar tipo Dunningan (FPLD), la distrofia muscular de Emery-Dreifuss (EDMD) y la progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS). La adipogénesis es controlada por una inhibición de PPAR $\gamma$  dependiente de Wnt-  $\beta$ -catenina [415] que promueve la degradación proteasomal de

$\beta$ -catenina [416]. Una reducción en la señalización Wnt-  $\beta$ -catenina podía causar defectos en la envoltura nuclear y disfunción de las células madre en los síndromes progeroides. Se ha visto que la acumulación anormal de prelamin A y los defectos observados en un modelo de ratón progérico en el cual el procesamiento de lamina A es defectuoso coincide con una regulación negativa de Wnt-  $\beta$ -catenina y anomalías en el número y capacidad proliferativa de células madre epidérmicas [417].

También se ha descrito que la lamina A afecta la señalización Notch, que se requiere para la diferenciación de las células madre mesenquimales, por unión a SKIP, un co-activador de genes diana de Notch [364]. Se ha visto que la progerina, forma mutante de la lamina A que causa HGPS, interfiere con la función de las células madre mesenquimales humanas (MSCs) [364]. Scaffidi y Mistele en 2008, encontraron que la expresión de progerina activa los principales efectores de la ruta de señalización Notch, y que la inducción de progerina en MSCs cambia su identidad molecular y potencial de diferenciación [364].

Además, dado que las mutaciones en genes que codifican para proteínas de la membrana nuclear causan enfermedades raras monogénicas, se considera la posibilidad de que las variantes polimórficas de estos mismos genes predispongan o contribuyan cuantitativamente al desarrollo de enfermedades comunes. En este sentido, teniendo en cuenta que las mutaciones en *LMNA* causan desordenes raros de lipodistrofia, varios grupos de investigación han examinado si los polimorfismos de este gen contribuyen al desarrollo de enfermedades comunes. Aunque los resultados aún no son concluyentes, algunos estudios sugieren que las variantes polimórficas en *LMNA* podrían predisponer a: resistencia a la insulina, diabetes mellitus y síndrome metabólico [418] [419] [420] [421] [422] [423].



## **OBJETIVOS**





## 2. OBJETIVOS

Las lipodistrofias familiares son enfermedades sumamente infrecuentes, por lo que conseguir estudiar una muestra representativa no es tarea fácil. Como tampoco lo es obtener el material biológico adecuado sobre el que realizar estudios moleculares, en el caso de este trabajo, el tejido adiposo, precisamente el gran ausente en este tipo de patologías.

Es por ello que esta Tesis se ha centrado, fundamentalmente, en el estudio de uno de los subtipos de las lipodistrofias familiares, la lipodistrofia parcial familiar (FPLD).

Cuando iniciamos este proyecto en el año 2008 sólo se conocían 3 genes causantes de la FPLD: *LMNA*, *PPARG* y *AKT2* (en este último, y hasta la fecha, sólo se ha publicado un pedigrí afectado). En los últimos 2 años se han identificado 3 nuevos loci (*PLIN1*, *CIDEA* y *CAVI*) relacionados con este tipo de lipodistrofia. Es por ello que en los objetivos iniciales nos hemos centrado en los genes que se han asociado con más frecuencia con ese tipo particular de patología, *LMNA* y *PPARG*. Nuestro trabajo continúa y en estos momentos estamos a punto de conocer los resultados de la secuenciación de más de 60 genes relacionados con el desarrollo del tejido adiposo, el ciclo celular y el metabolismo lipídico e hidrocarbonado, de aquellos pacientes en los que no hemos encontrado mutaciones en los citados genes, mediante las nuevas plataformas de ultrasecuenciación.

### Generales:

1. Hacer un diagnóstico genético de pacientes con diagnóstico clínico de FPLD.
2. Obtener evidencias que contribuyan a esclarecer los mecanismos moleculares por los que se produce la pérdida de tejido adiposo (TA) en pacientes con lipodistrofias familiares.

### Específicos:

- Identificar mutaciones causantes de lipodistrofia parcial familiar en los dos genes que más frecuentemente se asocian con la misma (*LMNA* y *PPARG*).
- Aportar más información a la relación genotipo-fenotipo en los pacientes con FPLD que facilite el diagnóstico molecular.
- Estudiar la expresión de adipogenes y marcadores de adipocitos maduros, así como de genes del ciclo celular en muestras de TAsc procedentes de pacientes con FPLD2.
- Estudiar las características ultraestructurales de las células del TA procedente de pacientes con FPLD2.
- Analizar *ex vivo* e *in vitro* el papel de la prelamina A en la FPLD2.
- Evaluar la adipogénesis en fibroblastos humanos de un paciente con BSCL2.



## **SUJETOS Y MÉTODOS**



### 3. SUJETOS Y MÉTODOS

#### 3.1. SUJETOS

Se estudiaron un total de 59 mujeres, de edades comprendidas entre 20-70 años, con diagnóstico de sospecha clínica de lipodistrofia parcial familiar. Los criterios clínicos y bioquímicos para considerar a una paciente como sospechosa de padecer lipodistrofia parcial familiar (FPLD) se indican en la Tabla 3.1. Posteriormente, y a medida que se identificaron las mutaciones responsables del cuadro clínico, se incluyeron en el estudio un total de 30 pacientes (13 hombres y 17 mujeres), todos ellos familiares de las pacientes portadoras de mutaciones en *LMNA* o *PPARG*. Del total de mujeres estudiadas con sospecha de FPLD (n=76), 2 fueron de origen asturiano, 10 procedían de la provincia de Huelva, 2 de Málaga, una de Salamanca y una de Texas (USA), siendo el resto de Galicia (n=60).

Como controles se estudiaron diferentes grupos de individuos en función del tipo de experimento llevado a cabo. Así, para la evaluación de las características antropométricas, de composición corporal y variables bioquímicas en plasma, se estudiaron un total de 69 mujeres (45 sin diabetes mellitus y 24 con diabetes mellitus tipo 2) equiparables en edad e índice de masa corporal (IMC). De este grupo control, se incluyeron a 21 mujeres se les cuantificó la composición corporal mediante densitometría de absorción de rayos X (DEXA). Estas mujeres no presentaban características clínicas de lipodistrofia de ningún tipo, y fueron reclutadas de las consultas de Endocrinología del C.H.U.S. a donde habían acudido por patologías tiroideas no neoplásicas o por obesidad. En el momento del estudio todas las pacientes control estaban eutiroides. Los criterios de exclusión para este grupo fueron: embarazo, patología neoplásica, insuficiencia cardíaca severa, insuficiencia hepática, insuficiencia renal crónica severa, broncopatía crónica severa u otras endocrinopatías.

Además del grupo control de individuos sanos, se incluyó un grupo de 7 pacientes FPLD2 debido a la mutación *LMNA* R482W, pertenecientes al pedigrí L.1, diagnosticados previamente por nuestro grupo [341]. Esta mutación da lugar a la forma clásica de la enfermedad, y el grupo se utilizó como estándar para el diagnóstico clínico y para una parte de los estudios moleculares en tejido adiposo subcutáneo.

Para el análisis de las características histológicas y moleculares del tejido adiposo subcutáneo de pacientes con FPLD estudiamos 9 individuos con este diagnóstico (7 con la mutación *LMNA* R482W y dos con una de las nuevas mutaciones encontradas, *LMNA* I299V) y 23 sujetos sanos equiparados en sexo, edad e IMC.

Para el estudio de la lipomatosis asociada a la lipodistrofia parcial familiar se estudiaron: 4 pacientes con esta patología (2 con la mutación R482W y 2 con la mutación I299V), 13 sujetos con lipomas y sin lipodistrofia y 2 sujetos sanos.

Se estudió además a un hombre de 18 años con el diagnóstico clínico y molecular de lipodistrofia congénita generalizada (Síndrome de Berardinelli-Seip).

A todos los sujetos que participaron en estos estudios se les informó de los riesgos que conllevaban los mismos, y todos ellos dieron su consentimiento por escrito para participar en el estudio y para la publicación de su información clínica, bioquímica y genética. Estos estudios fueron autorizados por el Comité de Ética de Investigación Clínica de la Consellería de Sanidade de la Xunta de Galicia. En todo momento fueron observadas las recomendaciones de la Declaración de Helsinki para la experimentación con seres humanos.

De la totalidad de los pacientes estudiados, 40 fueron evaluados clínica y bioquímicamente en el Servicio de Endocrinología del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS). En particular, los estudios de composición corporal mediante DEXA fueron realizados por la Dra. Ana Castro, Mary Lage y Marcos Pazos. La información clínica y bioquímica de los restantes 17 pacientes fue amablemente cedida por los siguientes facultativos: Dra. María Jesús Díaz del Hospital Central de Asturias (2 pacientes del mismo pedigrí), Dr. Pablo Prieto del Hospital Clínico Universitario de Salamanca (una paciente), Dr. Francisco Fernández del Hospital Puerta de Europa de Huelva (13 pacientes de 4 pedigríes) y Prof. Joaquín Lado-Abeal del Departamento de Medicina Interna, Texas Tech University Health Sciences Center (Lubbock, Texas, USA) (una paciente).

Las biopsias de piel, tejido adiposo y la extirpación de los lipomas se realizaron en los quirófanos del Servicio de Cirugía General del CHUS por el Prof. Francisco Barreiro y el Dr. Daniel Prieto (Hospital Clínico Universitario de Santiago). Los estudios anatómo-patológicos se llevaron a cabo en el Servicio de Anatomía Patológica del CHUS y en el Departamento de Ciencias Morfológicas de la USC (Facultad de Medicina) por el Prof. Andrés Beiras y la Dra.

Beatriz Fernández. La mayor parte de los estudios moleculares e *in vitro* se realizaron en la Unidade de Enfermidades Tiroideas e Metabólicas (UETeM) del Departamento de Medicina (Facultad de Medicina, Universidade de Santiago de Compostela). Una pequeña parte de los estudios moleculares se llevaron a cabo en el Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) en Bolonia (Italia) por la Dra. Giovanna Lattanzi y en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de Barcelona por el Prof. Francesc Villarroya.

Tabla 3.1: Criterios clínicos y bioquímicos seguidos para considerar a una paciente como sospechosa de padecer FPLD.

<b>CRITERIOS DE SOSPECHA DE FPLD</b>
<b>CRITERIOS MÍNIMOS</b> Mujeres pre-menopáusicas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pérdida de grasa en nalgas y extremidades inferiores</li> <li>• Inicio del cuadro después de la pubertad</li> </ul> Mujeres post-menopáusicas: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pérdida de grasa en nalgas y extremidades inferiores</li> <li>• Diabetes mellitus tipo 2 y/o hipertrigliceridemia</li> <li>• Familiares de primero y segundo grado con la misma clínica y/o diabetes mellitus y/o hipertrigliceridemia</li> </ul>
<b>CRITERIOS DE ALTA SOSPECHA</b> Los anteriores y además: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipertrofia muscular</li> <li>• Flebomegalia</li> <li>• Acantosis nigricans/acrocordones</li> <li>• Resistencia a la insulina/hiperinsulinemia</li> <li>• Hipoleptinemia</li> <li>• Familiares de primer y segundo grado con fenotipo lipodistrófico</li> </ul>
<b>CRITERIOS DE ALTA SOSPECHA DE LA FORMA CLÁSICA DE FPLD TIPO DUNNIGAN</b> Los anteriores y: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausencia de grasa en extremidades superiores</li> <li>• Acúmulo de grasa en sotabarba y axilas</li> <li>• Inicio del cuadro después de la pubertad</li> <li>• Ausencia o no acúmulo de grasa subcutánea abdominal</li> <li>• Familiares de primero y segundo grado con la misma clínica</li> </ul>

### 3.2. MÉTODOS

#### Diseño experimental

##### 1. DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y ESTUDIO DE LA RELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

- Identificación de mutaciones responsables de FPLD y relación genotipo-fenotipo.

##### 2. ESTUDIOS *EX VIVO* HISTOLÓGICOS Y MOLECULARES

- Estudios de microscopía óptica, inmunohistoquímica, ultraestructurales y moleculares en muestras de tejido adiposo procedentes de pacientes con FPLD2:
- Tejido adiposo subcutáneo de pacientes con la forma clásica de FPLD2
- Lipomatosis asociada a la lipodistrofia parcial familiar. Tejido adiposo lipomatoso y no lipomatoso de estos pacientes.

##### 3. ESTUDIOS *IN VITRO*

- Estudio funcional de la mutación C591F en el gen *LMNA*
- Estudio *in vitro* del papel de las hormonas sexuales en la adipogénesis y su relación con la acumulación de prelamina A farnesilada
- Estudio *in vitro* de la adipogénesis en fibroblastos primarios de un paciente con lipodistrofia congénita generalizada tipo 2.

##### 3.2.1. DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y ESTUDIO DE LA RELACION GENOTIPO-FENOTIPO

###### 3.2.1.1. Identificación de mutaciones responsables de FPLD y relación genotipo-fenotipo

###### 3.2.1.1.A. Evaluación clínica

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les realizó una historia clínica completa, con una evaluación pormenorizada de los criterios diagnósticos de FPLD, así como de los criterios de exclusión.



### 3.2.1.1.B. Estudios antropométricos

Todos los pacientes, tras 10-12 horas de ayuno nocturno, fueron tallados con un estadiómetro estándar y pesados en ropa interior. Se cuantificaron, con una cinta métrica flexible, el perímetro abdominal a nivel de las crestas ilíacas, el perímetro de las caderas a nivel del trocante mayor y el perímetro de la raíz del muslo no dominante. Los pliegues cutáneos se cuantificaron con un compás de pliegues (Cambridge Scientific Industries, Cambridge, MD) en las siguientes localizaciones: bíceps, tríceps, suprailíaco, subescapular, muslo y pantorrilla, según el procedimiento estándar.

### 3.2.1.1.C. Estudios de composición corporal

La composición corporal se evaluó mediante densitometría de absorción de rayos X (DEXA) utilizando un densitómetro Lunar model DPX apparatus (GE Medical Systems, Pittsburgh, PA, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los pacientes (n= 43) y controles (n= 21) fueron estudiados en ayunas entre las 8:30 y 10:30 de la mañana en el Servicio de Endocrinología del C.H.U.S.

### 3.2.1.1.D. Estudio de sensibilidad a la insulina

A todos los pacientes y controles se les cuantificó la sensibilidad a la insulina ( $S_i$ ) mediante el método HOMA-RI [424] [425]. Se consideró que un paciente presentaba resistencia a la insulina cuando el índice HOMA-RI era igual o mayor que 3.8 [426].

En un subgrupo de 7 pacientes con diagnóstico molecular de FPLD (R482W) y 10 sujetos controles equiparados en edad, sexo e IMC la sensibilidad a la insulina se cuantificó mediante la técnica del Modelo Mínimo aproximado de la glucosa [427].

El Modelo Mínimo del metabolismo de la glucosa (MMg) [427] es un procedimiento para cuantificar la sensibilidad a la insulina. Está basado en una ruptura del *feedback* glucemia/insulinemia, pero no experimental sino matemática. La sensibilidad a la insulina se determina en una situación experimental no estacionaria, a través de un test de tolerancia intravenosa a la glucosa con muestreo frecuente (TTIVGMF). El modelo mínimo de Bergman se utilizó para calcular los índices, tanto de sensibilidad a la insulina ( $S_i$ ) como la efectividad de la glucosa con insulina basal ( $S_G$ ) [427] [428].

Los parámetros del modelo se estimaron utilizando una técnica de mínimos cuadrados no lineal con un programa propio (STELLUM-MMg).

El procedimiento experimental del MMg fue el siguiente:

Cada sujeto acudió al hospital a las 8:30 a.m. después de 12 horas de ayuno. Al sujeto acostado se le canularon las venas antecubitales de ambos brazos con un catéter de 20 gauge (Abbocath-T 20G; Abbott, Dublin, Ireland). Uno de los catéteres fue utilizado para el muestreo de sangre y el otro para administrar la glucosa e insulina. Los catéteres se mantuvieron permeables mediante la infusión de una solución salina isotónica 0.9 %.

Se tomaron muestras de sangre 20, 15, 10, 5 y 1 minuto antes de la inyección de glucosa, para determinar los valores plasmáticos basales de glucosa e insulina. En el tiempo cero, se procedió con la inyección de dextrosa 0.3 g/Kg 50% (peso/vol) (Glucosmon R/50; Leo, Madrid, Spain), que se completó en menos de 2 minutos, y las posteriores tomas de muestras de sangre se llevaron a cabo a los 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 19, 22, 23, 24, 25, 27, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 120, 140, 160 y 180 minutos después de haber iniciado la inyección. La administración de un bolo de insulina regular (0.05 UI/kg peso, Actrapid, NovoNordisk, Dinamarca) tuvo lugar a los 20 minutos de la inyección de glucosa. Las muestras de sangre se recogieron en tubos de vidrio previamente enfriados, conteniendo heparina-litio y 4 mg de NaF. Todas las muestras se mantuvieron en hielo hasta su centrifugación. Una vez centrifugadas se congelaron a -20 °C, pendientes de realizar las determinaciones de glucosa e insulina [429] [243].

### *3.2.1.1.E. Determinaciones bioquímicas en plasma*

A partir de una muestra de sangre venosa tomada en ayunas (10-12 horas de ayuno nocturno) se llevó a cabo la determinación en plasma de: glucosa, insulina, Hb A1c, leptina, colesterol fraccionado, TNF-alfa, IL-6 y proteína C reactiva. Las determinaciones bioquímicas se realizaron en el Laboratorio Central del CHUS.

Las concentraciones de glucosa en plasma se determinaron utilizando el método de glucosa oxidasa en un analizador de glucosa (Yellow Springs Instruments Co., Yellow Springs, OH, USA). Las concentraciones de insulina en el plasma se determinaron en duplicado por quimioluminiscencia utilizando un *kit* comercial (Nichols Institute, CA, USA).

El perfil lipídico del suero fue caracterizado por los métodos estándar.

La hemoglobina glicosilada (Hb A1c) se determinó por cromatografía de intercambio iónico en un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). El TNF-alfa y IL-6 se midieron por ELISA (“enzyme-linked immunoassay”) de alta sensibilidad (R&D Systems, Inc., MN, USA). La leptina plasmática se determinó mediante ELISA (DRG International, Inc., USA).

#### *3.2.1.1.F. Detección de mutaciones*

##### **Aislamiento de linfocitos**

A partir de una muestra de sangre venosa tomada en ayunas (tal como se describe en la sección 3.2.1.1.E), se creó un gradiente de densidad según el procedimiento estándar [430], para separar los linfocitos del resto de las células de la sangre. Con este fin, se añadió cuidadosamente la sangre diluida 1:1 con PBS sobre 3 ml de Histopaque (Sigma Aldrich) en un tubo de centrifuga cónico de 15 ml. Se centrifugó a 1800 rpm durante 30 min., a temperatura ambiente. Con una pipeta Pasteur se recogió la interfase opaca, correspondiente a los linfocitos, y se transfirió a un tubo de centrifuga cónico de 1.5 ml con 0.5 ml de PBS; posteriormente, se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min. a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el precipitado de linfocitos fue almacenado a -80 °C, hasta ser procesado para la extracción de ácidos nucleicos.

##### **Extracción de ADN**

El ADN se preparó a partir linfocitos de sangre periférica según el procedimiento estándar [431]. Para esto se utilizó el “RealPure genomic DNA extraction kit” (Durviz SL, España), siguiendo las instrucciones del fabricante (Figura 3.1). Se lisaron las células con 600 µl de tampón de lisis, luego se precipitaron las proteínas con 360 µl de solución de eliminación de proteínas, posteriormente el ADN fue precipitado con 600 µl de isopropanol y por último se lavó el precipitado con etanol al 70 %, dejándolo secar a temperatura ambiente y resuspendiéndolo en la solución de hidratación (50-100 µl, según el tamaño del precipitado obtenido).



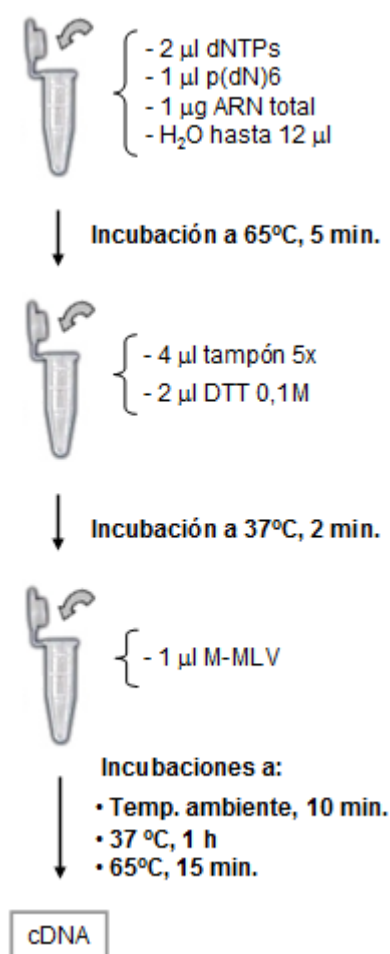


Figura 3.3: Esquema de la retrotranscripción con el *kit* de M-MLV RT.

### Secuenciación

La detección de mutaciones se realizó mediante secuenciación directa sobre fragmentos de ADN o ADNc amplificados por PCR. Se estudiaron los dos genes que con mayor frecuencia se asocian a FPLD: *LMNA* y *PPARG*.

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR se diseñaron con el programa Primer Express® Software v2.0 (Applied Biosystems) y la síntesis se solicitó a Sigma-Aldrich (Tabla 3.2).

Con las muestras de ADN se realizó un diseño para amplificar cada uno de los exones descritos en los diferentes genes y las secuencias intrónicas circundantes. Por otro lado, para las muestras de ADNc se diseñó la amplificación de fragmentos solapados que permitiera la correcta secuenciación de cada uno de los exones.

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 20 µl, con 100 ng de ADN genómico, tampón de reacción 1x, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, desoxi-NTPs 200 µM, 1 U de Ecotaq Polimerasa (Ecogen, España) y 0,25 µM de cada oligonucleótido.

Se utilizó un termociclador MWG Primus (MGW Biotech AG, España), con las siguientes condiciones de programación:

95 °C, 5 min (desnaturalización)

30-40 ciclos { 95 °C, 30 s (desnaturalización)  
54-63 °C, 30 s (anillamiento)  
72 °C, 30-60 s (extensión)

72 °C por 10 min (elongación final)

El número de ciclos y el tiempo de la extensión en cada uno de ellos se fijaron en dependencia del tamaño del fragmento [431]. La temperatura de anillamiento (hibridación) de cada fragmento aparece en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Diseño de amplificación de los fragmentos en *LMNA* y *PPARG*. Exones comprendidos en cada fragmento, secuencia de los cebadores: oligonucleótidos (sentido y antisentido) en dirección 5'-3', tamaño del fragmento amplificado y temperatura de anillamiento con la cadena molde.

Exón	Oligonucleótido SENTIDO	Oligonucleótido ANTISENTIDO	Fragmento (pb)	Temp.A. (°C)
<b><i>LMNA</i> (ADNc)</b>				
1	5'-CAGCGCTGCCAACCTGC-3'	5'-ACCCTCCTTCTTGGTATTGC-3'	397	62
2-4	5'-TGGAGCTGAGCAAAGTGCG-3'	5'-GCTGCAGCTCCTCGTGGGCAGC-3'	570	61
-7	5'-GGACAATGCCAGGCAGTCTG-3'	5'-GTGAACTTTGGTGGGAACCG-3'	651	62
8-11	5'-TCACTCATCCCAGACACAGGG-3'	5'-GAGCGGGTGACCAGATT-3'	723	60
11-12	5'-TCACCACCACGGCTCCAC-3'	5'-TGAGGAGGACGCAGGAAG-3'	359	63
<b><i>PPARG</i> (ADN)</b>				
Prom -1	5'-GCAGTCAGTATCATTTTGGGC-3'	5'-CCCAATAGCCGTATCTGGAA-3'	765	54
2	5'-CTGAAACTCTGTGAGATTGCTGTGT-3'	5'-GGGTACTGAGAGATGAGTCCAATT-3'	361	56
3	5'-GCATGAAGGTGTACTATGGTGGC-3'	5'-GCACTCTGGTCTGGGTGACAG-3'	401	57
4	5'-GAACCTGCCTTTTCTGATTCCC-3'	5'-GCATTTGGTGGAAAACTGTACAC-3'	351	56
5	5'-AACGAGGGCTGGGAGAGC-3'	5'-TGTGTGTGCATTTGTAGCGC-3'	381	56
6 (1°)	5'-CATAAACAGTTTTCTGAACCTGGG-3'	5'-TCTTTATTCATCAAGGAGGCCA-3'	361	56
6 (2°)	5'-TGCCAAAAGCATTCTGGT-3'	5'-TGCAGACTAAGGAAATCCA-3'	381	57
7	5'-TAGGCCTCCAAGGCGGG-3'	5'-AATTCTTAGGTGTCAGATTTCCC-3'	402	58

Temp.A., temperatura de anillamiento; Prom, promotor; 6 (1°), 6 (2°), exón 6 primera y segunda parte

Además, para la amplificación del gen *LMNA* a partir de ADN utilizamos el “LMNA gene amplification kit for direct sequencing” (Diatheva, Fano, Italia), siguiendo exactamente las instrucciones del fabricante.

La amplificación de los fragmentos tras la PCR fue confirmada a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1% en presencia de bromuro de etidio y visualizados por excitación UV [431] en el QUANTUM ST4-1000/26MX (Ecogen, Madrid, Spain).

Estos fragmentos fueron purificados con el *kit* Exosap it (GE HealthCare, Piscataway, NJ, USA) según las instrucciones del fabricante, y se sometieron a una reacción de secuenciación, que incluye la realización de PCR, empleando el *kit* de secuenciación ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Los productos resultantes se secuenciaron mediante electroforesis capilar empleando el equipo para el análisis automatizado de secuencias ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para cada fragmento se secuenciaron las dos cadenas, y en aquellos casos en los que existió duda sobre la presencia de mutaciones se procedió a un segundo método de análisis, como es el análisis de restricción enzimática. Para ello se amplificó por PCR el fragmento de ADN de interés, para posteriormente someterlo a digestión mediante una enzima de restricción seleccionada tras previo estudio del mapa de restricción (New England Biolabs, Inc / Genecraft), siguiendo las instrucciones del proveedor de la enzima; y por último, se analizaron los fragmentos obtenidos en un gel de agarosa al 2%.

### 3.2.2. ESTUDIOS *EX VIVO* HISTOLÓGICOS Y MOLECULARES

3.2.2.1. Estudios de microscopía óptica, inmunohistoquímica, ultraestructurales y moleculares en muestras de tejido adiposo procedentes de pacientes con FPLD2

#### 3.2.2.1.A. *Biopsias de piel, tejido adiposo y extirpación de lipomas*

Las muestras de piel, tejido adiposo subcutáneo y los lipomas se obtuvieron mediante los procedimientos quirúrgicos estándar que a continuación se describen. Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron en quirófano y bajo condiciones de asepsia por cirujanos titulados.



**a) Tejido adiposo subcutáneo de pacientes con la forma clásica de FPLD2**

Las muestras de grasa subcutánea se obtuvieron de dos localizaciones por paciente (7 con FPLD y 10 controles), subcutánea abdominal (2 cm debajo del ombligo) y subcutánea periférica (aspecto lateral del muslo). Tras haber anestesiado la zona con lidocaína al 2% se procedió a practicar una incisión de 2 cm en la piel, exponiendo posteriormente la grasa subcutánea. De cada localización se tomó una muestra de aproximadamente 2 gramos de tejido adiposo. Una vez eliminado el tejido conectivo visible y los vasos sanguíneos, cada muestra fue fraccionada y congelada una parte de forma rápida en nitrógeno líquido para evitar la degradación del ARN (luego almacenada a -80°C hasta su posterior análisis); la otra porción se fijó en glutaraldehído tamponado para realizar los estudios de microscopía electrónica.

En algunos pacientes y controles se aprovechó la biopsia de tejido adiposo para obtener una pequeña muestra de piel (4 x 1 mm) que fue inmediatamente sumergida en medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) con 10 % de suero fetal bovino para la obtención de fibroblastos primarios.

**b) Estudio de la lipomatosis asociada a la lipodistrofia parcial familiar. Tejido adiposo lipomatoso y no lipomatoso en estos pacientes.**

Se obtuvieron muestras de lipomas de 4 pacientes con FPLD2 y de 13 sujetos controles según los procedimientos quirúrgicos estándar. Como controles se utilizaron muestras de lipoma de pacientes seguidos en la Unidad de Cirugía Mayor Ambulatoria del CHUS. Además, en todos los pacientes y controles a los que se les extirpó un lipoma se obtuvo una muestra de grasa no lipomatosa adyacente al lipoma en cuestión. Las características de estos pacientes control no lipodistróficos y la localización de los lipomas extirpados se indican en la Tabla 3.3. De modo similar a lo realizado con las muestras de grasa subcutánea anteriormente descritas, una parte del tejido adiposo lipomatoso y no lipomatoso fue inmediatamente sumergido en nitrógeno líquido para su posterior conservación a -80°C, otra parte fue sumergida en glutaraldehído para los estudios ultraestructurales y otra en formol para los estudios de microscopía óptica e inmunohistoquímica.

Tabla 3.3: Características clínicas de los sujetos estudiados.

Paciente	Sexo	Edad	FPLD2	Localización lipoma	Cáncer	DM2	HTA	ECV
1	M	66	R482W	Espalda	Colon	No	No	Ictus
2	F	40	R482W	Abdomen	No	No	No	No
3	F	43	I299V	Muslo	No	Sí	Sí	No
4	F	70	I299V	Abdomen	No	Sí	Sí	No
5	F	59	NO	Espalda	No	No	No	No
6	F	53	NO	Espalda	Recto	No	Sí	No
7	F	59	NO	Muslo	No	GBA	No	No
8	M	28	NO	Abdomen	No	No	No	No
9	F	29	NO	Espalda	No	No	No	No
10	F	56	NO	Brazo	No	No	No	No
11	F	25	NO	Espalda	No	No	No	No
12	F	60	NO	Brazo	No	No	No	No
13	F	31	NO	Muslo	No	No	No	No
14	F	53	NO	Espalda	No	GBA	No	No
15	F	66	NO	Abdomen	Mama	Sí	Sí	No
16	M	62	NO	Brazo	No	Sí	Sí	No
17	M	28	NO	Muslo	No	No	No	No

DM2: diabetes mellitus tipo 2, HTA: hipertensión arterial, ECV: enfermedad cardiovascular, GBA: Glucemia basal alterada

### 3.2.2.1.B. Estudios histológicos

#### Microscopía óptica

Las muestras fueron fijadas en formol y posteriormente embebidas en parafina. Secciones de 4  $\mu\text{m}$  de grosor fueron teñidas con hematoxilina-eosina (HE) y analizadas en un microscopio óptico (Olympus BX51, Hamburg, Germany).

Para el estudio morfométrico, se analizaron 30 adipocitos por muestra, seleccionados al azar. Se midió el diámetro mayor y el menor de cada adipocito usando un micrómetro ocular (40x) (Olympus, Hamburg, Germany). A continuación fue calculado el diámetro medio de cada adipocito (usando la medida de los 2 diámetros, mayor y menor) y finalmente calculamos la media de todos los adipocitos de la muestra.

### **Inmunohistoquímica**

En todas las muestras de lipoma y grasa adyacente se realizaron estudios de inmunohistoquímica para identificar marcadores de inflamación (macrófagos: CD-68, linfocitos T: CD-3, linfocitos B: CD-20 y células plasmáticas: CD-138) y la proporción de proliferación celular mediante tinción para Ki67.

Las secciones se montaron en láminas para microscopio FLEX IHC (Dako, Glostrup, Denmark) y fueron calentadas en un horno a 60°C durante 1 h. La técnica inmunohistoquímica se realizó utilizando un sistema automático de tinciones “AutostainerLink 48” (Dako). Después de desparafinar y desenmascarar el epítipo en “Vision FLEX target retrieval solution”, a pH alto durante 20 min. a 97°C, las láminas se dejaron enfriar hasta 65°C en “PT Link” y entonces se lavaron en tampón de lavado durante 5 min. a temperatura ambiente. Luego se siguió el protocolo de tinción inmunohistoquímica o inmunotinción con las siguientes incubaciones: (1) en el reactivo de bloqueo de la peroxidasa de Vision FLEX durante 5 min.; (2) en anticuerpos primarios FLEX listos para usar contra: CD68 (PG-M1), CD3, CD20 y CD138; (3) “EnVision FLEX + mouse (linker)” durante 15 min.; (4) EnVision FLEX/HRP (polímero de dextrano conjugado con peroxidasa y anticuerpo anti-Igs de ratón, producido en cabra y aislado por afinidad), durante 20 min.; (5) solución de trabajo del sustrato (mezcla) (solución del cromógeno 3,3'- diaminobenzidina tetrahidroclorídrico durante 10 min.; y (6) EnVision FLEX hematoxilina durante 9 min. El índice de proliferación evaluado por detección del marcador de proliferación Ki67 fue estimado usando ACIS III Image Analysis (Dako, Glostrup, Denmark).

### **Microscopía Electrónica**

Se fijaron pequeños fragmentos de tejido adiposo (TA) con glutaraldehído 2.5% en tampón cacodilato 0.15 M, pH 7.3, a 4°C. Posteriormente fueron lavados con el mismo tampón y sometidos a post-fijación, 1h a 4°C, en tetraóxido de osmio (OsO<sub>4</sub>) al 1 % en tampón cacodilato, deshidratados y embebidos en resina epoxi Spurr. Las secciones se analizaron utilizando el microscopio electrónico de transmisión Zeiss 902. Las características ultraestructurales de las muestras de los pacientes fueron comparadas con muestras de TA procedentes de controles sanos procesadas de igual modo.

### 3.2.2.1.C. Expresión proteica determinada por Western blot

Se obtuvieron extractos de proteínas totales a partir de las muestras de tejido adiposo (TA) congeladas, según se describe en la sección 3.2.4.1. Se analizó por Western blot la expresión de:

- prelamina A en TA subcutáneo (procedente de abdomen y muslo) de 7 pacientes con la forma clásica de FPLD2 y 10 controles
- lamina A y C, prelamina A, p53, p21, C/EBPalfa, C/EBPbeta, PPARgamma, PPARgamma2, pRb, pRb-fosforilado y FACE1 (ver Tabla 3.5), en 8 muestras de TA de pacientes lipodistróficos (4 lipomas y 4 muestras de grasa adyacente) y en 8 muestras de sujetos controles (4 lipomas y 4 muestras de TA adyacente a los lipomas)

Con el fin de evaluar posibles diferencias en la solubilidad de las proteínas lamina A/C (entre las distintas muestras) se utilizaron dos métodos alternativos para la extracción de proteínas: 1) el precipitado (fase insoluble) obtenido por el método descrito en la sección 3.2.4.1 y Tabla 3.5 (tampón I) fue solubilizado en el tampón de carga caliente (100°C) ó 2) las muestras de TA fueron lisadas en tampón de lisis caliente (90°C), ver composición de este tampón en la Tabla 3.5 (tampón IV).

### 3.2.2.1.D. Expresión génica

En un estudio comparativo entre las muestras de tejido adiposo subcutáneo de tronco (abdomen) y extremidades inferiores (muslo) de pacientes y controles; así como, entre lipomas y tejido no lipomatoso de pacientes y controles, analizamos la expresión relativa de los genes: *LMNA*, *PPARG*, *SREBF1*, *RBI*, *CCND3*, *CCND1*, *LPL*, *SLC2A4* (*GLUT4*), *LEP*, *TP53* (p53), *CDKN1A* (p21), *CEBPA*, *CEBPB*, *MYC*, *FABP4*, *UCP1*, *DLK1* (Pref1), *ZMPSTE24* y *CELF1* (CUGBP1) a través de la RT-PCR en tiempo real (ver sección 3.2.4.2 y Tabla 3.6; Tabla I de ANEXO I).

El ARN total fue extraído de las muestras de tejido adiposo como se describe a continuación y se obtuvo el ADNc siguiendo el mismo protocolo de retrotranscripción descrito anteriormente (sección 3.2.1.1.F y Figura 3.3)

### Extracción de ARN total a partir de Tejido Adiposo

De las muestras de tejido adiposo congeladas se tomaron aproximadamente 50 mg para extraer ARN total utilizando el “RNeasy Lipid Tissue Mini Kit” (Qiagen) (Figura 3.4). Para la ruptura y homogenización del tejido se utilizó el TissueRuptor (Qiagen).



Figura 3.4: Esquema de la extracción de ARN total a partir de tejido adiposo, utilizando el “RNeasy Lipid Tissue Mini Kit” (Qiagen).

### 3.2.3. ESTUDIOS *IN VITRO*

#### 3.2.3.1. Estudio funcional de la mutación C591F en el gen *LMNA*

##### **Clonación del pCMV6-XL5-C591F-FLAG-LA por mutagénesis dirigida**

El plásmido pCMV6-XL5 (Origene Technologies, Rockville, MD) con la secuencia completa del ADNc de *LMNA* A *wild type* (WT) fue expresado desde el promotor CMV y marcado en el extremo 5' con una secuencia codificante para el epitopo FLAG (FLAG-LA). Se introdujo la mutación puntual C591F en el ADNc de *LMNA* usando el producto comercial para mutagenesis dirigida “QuickChange® II site-directed mutagenesis kit” (Stratagene, Madrid, España).

El diseño de los cebadores se realizó siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Instructions Manual Quickchange® II Site-directed Mutagenesis Kit, [www.stratagene.com](http://www.stratagene.com)) (ver Figura 3.5) Se diseñaron dos oligonucleótidos complementarios entre sí que contienen, ambos, la mutación:

Sentido: 5'-GCTGTGCGGGACCTTCGGGCAGCCTGCCGACAAG-3'

Antisentido: 5'-CTTGTCGGCAGGCTGCCCCGAAGGTCCCGCACAGC-3'.

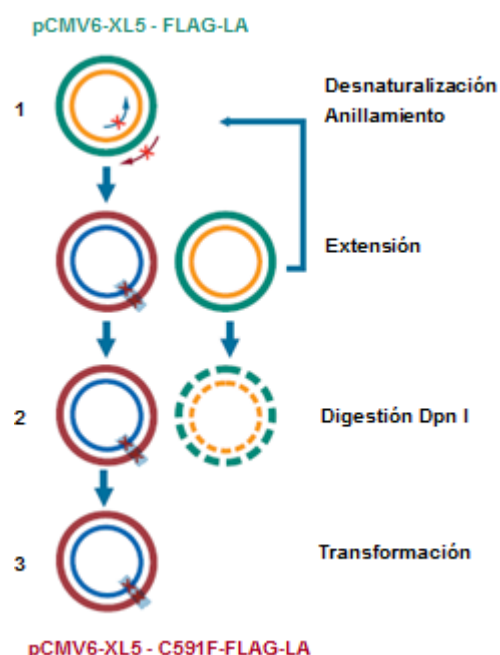


Figura 3.5: Clonación por mutagénesis dirigida (Quickchange® II Site-directed Mutagenesis Kit, [www.stratagene.com](http://www.stratagene.com)).

Síntesis de la hebra mutante

Ciclo térmico para conseguir:

- Desnaturalizar el plásmido pCMV6-XL5 - FLAG-LA (disociación de ambas cadenas).
- Anillar (a ambas cadenas) los oligonucleótidos de mutagénesis que contienen la mutación deseada.
- Extender los dos cebadores de mutagénesis con la enzima "PfuUltra™high-fidelity" (HF) (Stratagene, Madrid, España) para sintetizar una copia completa del plásmido portando la mutación.

Digestión enzimática con Dpn I

Digestión enzimática selectiva del ADN parental metilado y hemimetilado. Los plásmidos sintetizados de forma natural por las células JM109 presentan metilación en diversos puntos (5'-Gm6ATC-3'). La Dpn I (Stratagene, Madrid, España) digiere ADN metilado. Los plásmidos mutados sintetizados artificialmente por la enzima "PfuUltra™ high-fidelity DNA polymerase" no presentan metilación, por lo que no serán digeridos.

Transformación

Transformación de los plásmidos mutados en células supercompetentes XL1-blue.

## Transfección de los preadipocitos

Los preadipocitos de ratón 3T3-L1 procedentes de la Colección Europea de Cultivos Celulares fueron cultivados en DMEM con 10% de FBS y gentamicina 50 µg/ml (ver sección 3.2.4.3.b). Cuando estuvieron cerca de alcanzar la confluencia fueron transfectados con el vector de expresión pCMV6-XL5 conteniendo FLAG-ADNc de prelamina A *wild-type* (FLAG-WT-LA) o de prelamina A C591F (FLAG-C591F-LA) (ver especificaciones en el siguiente párrafo) e inducidos a la diferenciación añadiendo el coctel de diferenciación (insulina 5g/ml, dexametasona 0.25 µm y 3-isobutil-1- metilxantina 0.1 mM) (ver sección 3.2.4.3.c) durante 2 días.

La transfección de los plásmidos FLAG-LA o C591F-FLAG-LA se realizó en preadipocitos 3T3-L1 al día 0 de diferenciación, utilizando “Amaya Nucleofector system”, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### **Inmunofluorescencia**

Las células 3T3-L1 transfectadas fueron fijadas, el día 2 de la diferenciación, con metanol a -20°C e incubadas con BSA al 4% en PBS para saturar las uniones inespecíficas. La lamina A fue detectada usando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG conjugado con Cy3 (Sigma, M2). La tinción del núcleo fue contrastada por la tinción específica del ADN con dihidrocloruro de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich), 1µg/ml durante 5 min. Posteriormente las muestras fueron montadas con glicerol en presencia del reactivo “antifade” (para evitar el efecto de disminución de la fluorescencia por la fuente de luz). Finalmente las muestras fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia Nikon E600 equipado con cámara digital.

#### **3.2.3.2. Estudio *in vitro* del papel de las hormonas sexuales en la adipogénesis y su relación con la acumulación de prelamina A farnesilada**

Uno de los mecanismos que se han propuesto como responsables de la alteración de la adipogénesis en FPLD es la acumulación de prelamina A farnesilada. Por otra parte, resulta llamativo que el fenotipo lipodistrófico aparece en las mujeres con mutaciones en *LMNA* al inicio de la pubertad. En este sentido, una de las hipótesis de nuestro grupo es que las hormonas sexuales tienen que jugar un papel crucial en la alteración de la adipogénesis, más aún, como se podrá comprobar en la sección de RESULTADOS, cuando hemos encontrado acumulación de prelamina A también en muestras de tejido adiposo procedentes de áreas lipohipertróficas en una de las pacientes estudiadas. Con el fin de analizar el papel de las hormonas sexuales en la FPLD2 hemos diseñado un modelo *in vitro* en el que inducimos farmacológicamente la acumulación de prelamina A no farnesilada y farnesilada.



### Tratamiento con 17-beta estradiol

Los preadipocitos de ratón 3T3-L1 fueron cultivados como se describe en la sección 3.2.4.3.b y posteriormente incubados con el coctel de diferenciación (ver sección 3.2.4.3.c). Durante la inducción de la diferenciación fueron tratados con 17-beta estradiol (E2) a una concentración final de  $10^{-9}$  M, durante 6 días. La hormona fue disuelta previamente en DMSO, teniendo en cuenta que la concentración final de este disolvente no excediera el 0.01 %; además analizamos células no tratadas en las que añadimos una cantidad equivalente de DMSO como control.

### Tratamiento con inhibidores de la maduración de la lamina

Las células en cultivo, en presencia del coctel de diferenciación, tratadas o no con las hormonas sexuales, fueron incubadas con uno de los siguientes inhibidores de la maduración de la lamina:

- Inhibidor de la farnesil tranferasa, FTI-277 (Calbiochem, Darmstadt, Germany) 20  $\mu$ M las primeras 24 h [239] y, posteriormente, se mantuvo el tratamiento con FTI-277 2.5  $\mu$ M hasta el día 6 de diferenciación para inducir la acumulación de prelamina A no farnesilada por inhibición de la farnesilación.
- N-Acetil-S-farnesil-L-cisteina metil ester, AFCMe (Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland) 10 $\mu$ M las primeras 24 h y posteriormente mantuvimos el tratamiento con AFCMe 1  $\mu$ M hasta el día 6 de diferenciación [432] para inducir la acumulación de prelamina A farnesilada por bloqueo del último corte endoproteolítico del precursor de la lamina A.

### Evaluación del proceso adipogénico en las células tratadas

Se hizo con rojo oleoso a una muestra de cultivo de cada tratamiento para visualizar mejor las gotas de lípidos de las células diferenciadas (sección 3.2.4.3.d). Se recogió el resto de las células (sección 3.2.4.3.e) y, posteriormente, de una parte (cuatro réplicas por tratamiento) se extrajo el ARN total con el reactivo Trizol (Invitrogen); seguido de la retrotranscripción con la M-MLV RT de Invitrogen (ver sección 3.2.1.1.F). A partir del ADNc obtenido, se determinó (por duplicado cada muestra) por PCR en tiempo real la expresión relativa de los adipogenes *Pparg*, *Lmna*, *Ebpa*, *Ebpb*, *Lpl* y *Slc2a4*. Como gen de referencia se utilizó el *18ARNr* (ver: sección 3.2.4.2 y Tabla 3.6; Tabla I de ANEXO I). De una quinta muestra por cada tratamiento se extrajeron las proteínas totales y fueron analizadas por Western blot las

proteínas PPAR gamma, PPAR gamma2, lamina-prelamina A, EBP<sub>a</sub> y EBP<sub>b</sub> (ver sección 3.2.4.1 y Tabla 3.5).

### **Inmunofluorescencia**

Debido a la no disponibilidad en el mercado de anticuerpos anti-prelamina farnesilada de ratón, la acumulación de este precursor de la lamina A se evaluó en preadipocitos humanos, tratados, de modo similar, con los inhibidores de la maduración de la lamina A. La acumulación de prelamina A por efecto de los inhibidores de la maduración de la lamina A y los posibles cambios en la forma de los núcleos se evaluaron, a través de la inmunofluorescencia (ver protocolo en la sección 3.2.3.3.B).

### **3.2.3.3. Estudio *in vitro* de la adipogénesis en fibroblastos primarios de un paciente con lipodistrofia congénita generalizada tipo 2**

#### **3.2.3.3.A. Antecedentes clínicos del paciente**

Se estudió un sujeto con lipodistrofia congénita generalizada (CGL) (Figura 3.6) al cual se le había diagnosticado, por nuestro grupo, la mutación homocigótica en el exón 4, descrita previamente [8] NM\_001122955.2: c.517dup, p.Thr173AsnfsX5 (Nomenclatura de acuerdo a las Recomendaciones de la Sociedad de Variación del Genoma Humano), representada previamente como 669insA, F108fsX113. Los padres fueron heterocigóticos para la mutación y no mostraron fenotipo de CGL. No se identificó consanguinidad.

El diagnóstico clínico del paciente se había hecho desde los 22 meses de edad, basado en un fenotipo lipoatrófico, acantosis nigricans e hiperinsulinemia, con ausencia de tejido adiposo subcutáneo desde el nacimiento. Desde los 10 años de edad, el paciente presentó aumento de la presión arterial con glomeruloesclerosis segmentaria, hipertrigliceridemia, hepatomegalia y diabetes mellitus. El paciente también mostraba un retraso mental leve. Fue tratado con enalapril, fenofibrato, dieta y ejercicio físico hasta los 15 años de edad, y cuando su control de glucemia se hizo insuficiente (Hb A1c: 8.3%) empezó a ser tratado con metformina (850 mg bid) y glimepirida (1 mg qd).

En el examen físico a los 15 años de edad se observó ausencia completa de grasa, hipertrofia muscular, facies acromegaloide, manos y pies agrandados. Presentaba acantosis nigricans

severa en la nuca, axilas y fosa cubital, así como acrocordones en el cuello y axilas. El paciente presentaba además hepatomegalia (2 cm).

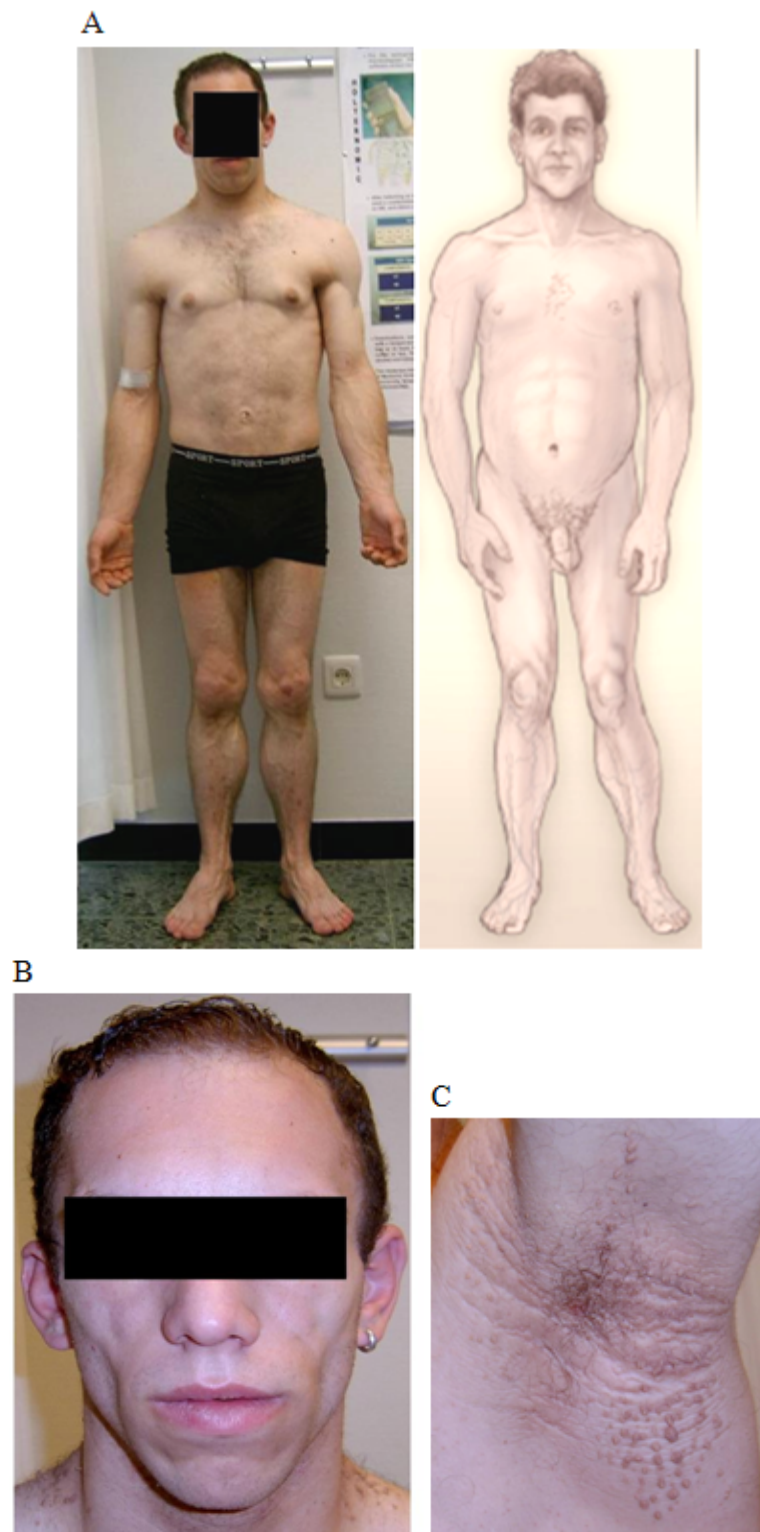


Figura 3.6: Paciente de 18 años con síndrome de Berardinelli-Seip por mutación en BSCL2. A) Vista frontal del paciente que muestra escaso TAsc en todo el cuerpo e hipertrofia muscular. B) Rasgos acromegaloides en la cara. C) Acanthosis nigricans y acrocordones en axila.

A los 18 años, el control metabólico seguía siendo deficiente (A1c: 10.2%) y, debido a que el paciente rechazó el tratamiento con insulina, se asoció rosiglitazona (4 mg qd). A esa edad, como se aprecia en la figura 3.7A, la sensibilidad a la insulina había empeorado. Después de 6 meses se incrementó la dosis de la glitazona a 8 mg qd. Después de un año con este tratamiento se observó una mejoría en el control metabólico (A1c: 8.9%) y en la sensibilidad a la insulina. La insulina plasmática y los triglicéridos se redujeron hasta valores normales y la leptina plasmática aumentó a 3.6 ng/dl. Por otra parte, no se observaron cambios en la composición corporal (Tabla 3.4), en el gasto energético basal (42.5 kcal/24hr/kg masa libre de grasa) ni el tamaño del hígado.

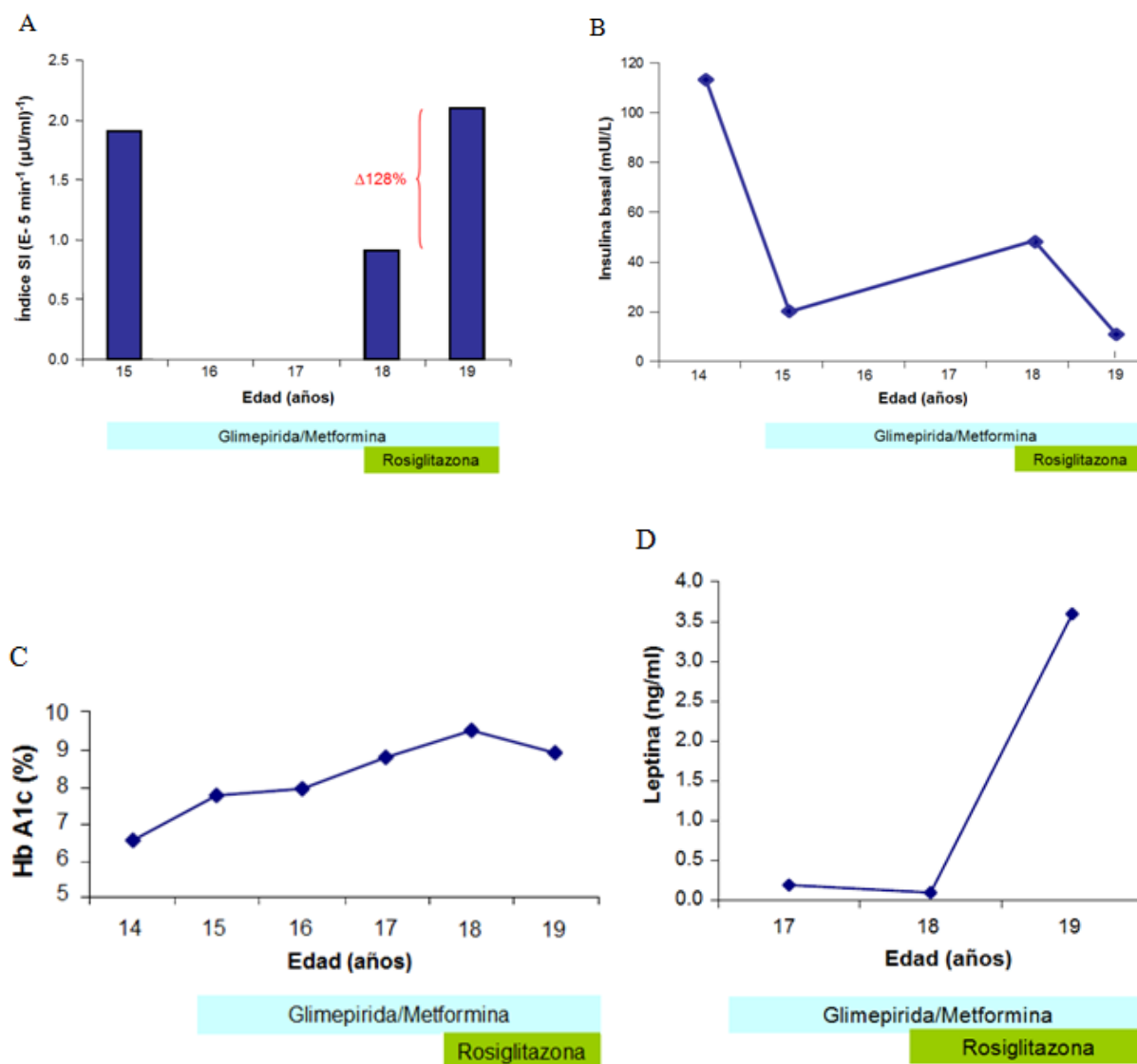


Figura 3.7: Efecto de la introducción de Rosiglitazona en el tratamiento para mejorar el control metabólico en el paciente BSCL2. A): Sensibilidad a la insulina. Determinaciones del índice de sensibilidad a la insulina (SI) en tres momentos de la vida del paciente sometido a tratamiento. Se muestra el incremento de un 128 % en el índice de sensibilidad a la insulina (SI) después de incluir en el tratamiento la Rosiglitazona. B): Insulina plasmática. C): Hemoglobina glicosilada (Hb A1c). D): Leptina plasmática.

Tabla 3.4: Características antropométricas y composición corporal.

	Metformina + Glimepirida		
		+ Rosiglitazona	
Edad (años)	15	18	19
Peso (kg)	73	75	74.8
Talla (cm)	170	171	172
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25.25	25.65	25.28
PC Bicipital (mm)	4.1	4.0	4.1
PC Tricipital (mm)	6.5	6.0	6.5
PC Subescapular (mm)	15.2	15.0	16.0
PC Suprailíaco (mm)	8.5	8.0	8.1
Masa grasa (kg)	4.68	3.01	3.74
MGL (kg)	68.8	68.1	71.06
% Masa grasa	6.4	4.0	5.0
% MGL	93.6	96.0	95.0

IMC, índice de masa corporal; PC, pliegue cutáneo; MGL, masa libre de grasa libre determinada por DEXA.

### 3.2.3.3.B. Estudio in vitro

#### Cultivo de células y tratamientos

A los 19 años, al paciente con diagnóstico de CGL se le hizo biopsia de piel, de axila y abdomen, para obtener cultivos primarios de fibroblastos, según los protocolos descritos en las secciones 3.2.2.1.A y 3.2.4.3.a. Los fibroblastos obtenidos fueron cultivados y tratados con el medio de diferenciación utilizado para la diferenciación de preadipocitos (siguiendo el mismo protocolo), en presencia o no pioglitazona (sección 3.2.4.3.c). Como control, se utilizó un cultivo primario de fibroblastos obtenidos a partir de una biopsia de piel (de abdomen) en un individuo sano (hombre de 31 años). Posteriormente al tratamiento, se recogieron estas células y fueron congeladas a -20 °C hasta ser utilizadas.

#### Inmunofluorescencia

Las células (fibroblastos primarios) cultivadas sobre cubreobjetos, fueron fijadas en paraformaldehído tamponado al 4% durante 1h a 4°C y permeabilizadas en Triton X-100 al 0.1% durante 10 min. Después de bloquear para eliminar uniones inespecíficas, las células fueron incubadas con el anticuerpo primario diluido en PBS: anti-prelamina A, cadena completa (ANT0045, Diatheva, Fano, Italia) o anti-prelamina A carboximetil-farnesilada (ANT0046, Diatheva, Fano, Italia). Después de tres lavados, las células fueron incubadas con

el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (H+L) (A21206); Molecular Probes, OR, USA). Los núcleos de las células fueron contrastados por tinción específica con DAPI (5µM). Los cubreobjetos se montaron en medio Fluoromount (Sigma, Barcelona, España). El análisis de las muestras se realizó a través de un microscopio de fluorescencia Nikon E600 equipado con una cámara digital.

### **Expresión de Proteínas**

Se obtuvieron extractos de proteínas totales a partir de los fibroblastos tratados y se analizó por Western blot la expresión de las proteínas PPAR $\gamma$  y FACE1 (ver sección 3.2.4.1 y Tabla 3.5).

### **Expresión génica**

A partir de las células congeladas, posterior al tratamiento, se extrajo el ARN total seguido de la retrotranscripción (ver sección 3.2.1.1.F) y se estudió, usando el ADNc obtenido, la expresión de varios genes claves relacionados con la adipogénesis y el metabolismo de la glucosa (*LMNA*, *PPARG*, *LPL*, *SLC2A4* (GLUT4), *LEP*, *FABP4* y *ZMPSTE24*), mediante RT-PCR en tiempo real, según el procedimiento descrito en la sección 3.2.4.2.

## **3.2.4. PROTOCOLOS GENERALES**

### **3.2.4.1. Western blot**

El análisis por Western blot de los lisados celulares de fibroblastos humanos, preadipocitos 3T3-L1 o muestras de tejido adiposo (TA) se realizó de acuerdo a las especificaciones que aparecen en la Tabla 3.5 para las diferentes proteínas estudiadas.

Las muestras se lisaron en una solución tamponada, con detergentes e inhibidores de proteasas y fosfatasas (Tabla 3.5), en la que fueron sometidas a pulsos cortos de ultrasonido en un Digital Sonifier with 102C CE Converter (Branson, USA), y posteriormente centrifugadas (a máxima velocidad durante 15 minutos) para eliminar detritos celulares. En el caso de las muestras de TA, se realizaron dos centrifugaciones secuenciales cortas previamente para eliminar la capa más gruesa de grasa. Se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford. Los extractos de proteínas totales, en tampón de muestra Laemmli en condiciones reductoras, se sometieron a separación electroforética por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (Amersham, GE

Healthcare, Piscataway, NJ, USA) o de PVDF (Millipore, Billerica, MA, USA) utilizando el equipo Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratorios Inc., Hercules, CA, USA). Después de bloquear la membrana con leche en polvo descremada al 3-5% en solución salina fosfato tamponada y Tween 20 al 0,1% (PBS-T), ésta fue incubada con el anticuerpo primario correspondiente según como se especifica en la Tabla 3.5. Después de lavar tres veces durante 5 min. cada vez con PBS-T 0.1%, la membrana se incubó 1 hora con el anticuerpo secundario. A continuación, se repitieron los mismos lavados anteriores y se reveló con los reactivos de quimioluminiscencia “Supersignal West Dura extended duration substrate” (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-rabbit IgG conjugado con peroxidasa (Thermo Scientific, 32460, Rockford, IL, USA), anti-mouse IgG conjugado con peroxidada (GE Healthcare, NA931V, Piscataway, NJ, USA), diluidos 1:5000 en PBS-T. Para el control de carga utilizamos los siguientes anticuerpos de Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA): anti-GAPDH (G9545) 1:20.000, anti-beta-actina (A5316) 1:30.000 o anti-tubulina (T5168) 1:20.000.



Tabla 3.5: Anticuerpos utilizados y condiciones del Western Blot para la detección de diferentes proteínas.

Muestra	Proteína	Tampón de lisis	Proteínas totales (µg)	Acrid/Bis-acrilamida gel (%)	Anticuerpo	
					Referencia	Dilución/ Incubación
- 3T3-L1 - TA	Lamina A/C, Prelamina-A	I, ♦V IV	25 3T3-L1 55 TA	8	Lamin A/C, goat polyclonal (Santa Cruz, sc-6215)	1:500/1 h a Temp. A.
- TA	Lamina A/C, Prelamina A	I	55	8	MANLAC1 4A7, mouse monoclonal (cedido por Glenn E. Morris)	1:100/1 h a Temp. A.
- TA	Lamina A, Prelamina A	III	40	8	Lamin A, goat polyclonal (Santa Cruz, sc-6214)	1:500/1 h a Temp. A.
- Fh - TA	PPARγ	I	25 Fh 30 TA	8-10	PPARγ, rabbit polyclonal (Santa Cruz, sc-7196)	1:2000/1 h a Temp. A.
- 3T3-L1 - TA	PPARγ2	I	35 3T3-L1 35 TA	8-10	PPARγ2, goat polyclonal (Santa Cruz, sc-22020)	1:200/1 h a Temp. A.
- 3T3-L1 - TA	EBPβ	I	25 3T3-L1 55 TA	10-12	EBPβ (C-19), rabbit polyclonal (Santa Cruz, sc-150)	1:500/ T.noche a 4°C
- 3T3-L1 - TA	EBPα	I	25 3T3-L1 55 TA	10	EBPα (p42), rabbit polyclonal (Cell Signalling, #2843)	1:1000*/T.noche a 4°C
- 3T3-L1	Glut4	I	25	10	Glut4 (H61), rabbit polyclonal (Santa Cruz, sc-7938)	1:200 /1 h a Temp. A.
- TA	p53	I	55	10	p53 (B-P3), mouse monoclonal (Santa Cruz, sc-65334)	1:500/T.noche a 4°C
- TA	Rb	I	55	8	Rb (D20), rabbit monoclonal (Cell Signalling, #9313)	1:500 */T.noche a 4°C
- TA	Rb-P	I	55	8	Phospho-Rb (Ser780), rabbit monoclonal (Cell Signalling, #3590)	1:500*/T.noche a 4°C
- Fh - TA	FACE-1	II, I	45 Fh 55 TA	10	h-FACE-1, mouse monoclonal (cedido por C. López-Otin)	1:500/T.noche a 4°C

I: Tampón RIPA (Tris-HCl 50mM pH 8.0; NaCl 150mM; NP-40 1%; desoxicolato sódico 0.5%; SDS 0.1%; NaF 50 mM, cóctel completo de inhibidores de proteasas 1x; Na3VO4 1mM y PMSF 1 mM)

II: Tampón de lisis 1x (Tris- HCl 50mM, pH 7.4; NaCl 150mM; 1% Tween 20; NP-40 0.5%; NaF 50 mM; coctel completo de inhibidores de proteasas 1x, Na3VO4 2mM y beta-glicerofosfato 40mM)

III: NP-40 1%, desoxicolato de sodio 0.25%; NaCl 150 mM, EGTA 1mM; PMFS 1mM; NaF 1mM; aprotinina, leupeptina y pepstatina 1µM

IV: Tampón de lisis a 90°C (Tris-HCl 20mM, pH 7.5, SDS 1%, Na3VO4 1mM, PMSF 1mM, beta-mercaptoetanol 5% y cóctel completo de inhibidores de proteasas 1x).

♦V: Precipitado obtenido con el tampón I y resuspendido en tampón de carga a 100°C. \*, en PBS-T con albúmina sérica bovina al 4%. 3T3-L1, preadipocitos murinos. TA, tejido adiposo.

Fh, fibroblastos humanos. Temp. A., temperatura ambiente. T.noche, toda la noche.

#### 3.2.4.2. RT- PCR en tiempo real

A partir del ADNc (por duplicado cada muestra), se determinó por PCR en tiempo real la expresión relativa de un grupo de genes relacionados con la adipogénesis (Tabla 3.6, Tabla I de ANEXO I). Para ello se utilizaron sondas marcadas de Probe Library, diseño UPL (Roche) y los oligonucleótidos específicos según el diseño automatizado de Roche (Tabla 3.6). De este modo, amplificó el ADNc en un termociclador Light Cycler 2.0 system (Roche Diagnostics, Sant Cugat del Valles, España) con el siguiente programa: desnaturalización a 95 °C por 15 min., seguido de 40-50 ciclos a 95 °C por 20 s y 60 °C por 1 min. Los datos de expresión fueron normalizados a través del método  $2^{-\Delta\Delta^{ct}}$ , utilizando como control interno el gen constitutivo (o *housekeeping*) *POLR2A* para las muestras de origen humano y *G6pdx* ó *Rn18s* para las muestras de origen murino.

Tabla 3.6: Sondas y cebadores (oligonucleótidos) utilizados en el análisis por PCR en Tiempo Real.

Gen	No. de acceso en NCBI	Sonda * #	Oligonucleótido SENTIDO	Oligonucleótido ANTISENTIDO
<i>LMNA</i> (h)	NM_170707.2	9	5'-GACGAGGATGAGGATGGAGA-3'	5'-AGCGCAGGTTGTACTCAGC-3'
<i>ZMPSTE24</i> (h)	NM_005857.3	89	5'-AAGAGGAGCAGTCCTATGCTTTT-3'	5'-GGAAAGGCAGTTATCAGAGCA-3'
<i>PPARG</i> (h)	NM_015869.4	39	5'-ACCTGAAACTTCAAGAGTACCAAA-3'	5'-TGAGGCTTATTGTAGAGCTGAGTC-3'
<i>DLK1</i> (h)	NM_003836.4	68	5'-CATAGAGGCCATCGTCCAG-3'	5'-GACGGGGAGCTCTGTGATAG-3'
<i>MYC</i> (h)	NM_002467.4	34	5'-CACCAGCAGCGACTCTGA-3'	5'-GATCCAGACTCTGACCTTTTGC-3'
<i>CEBPB</i> (h)	NM_005194	74	5'-CGCTTACCTCGGCTACCA-3'	5'-ACGAGGAGGACGTGGAGAG-3'
<i>SREBF1</i> (h)	U00968.1	77	5'-CGCTCCTCCATCAATGACA-3'	5'-TGCGCAAGACAGCAGATTTA-3'
<i>CEBPA</i> (h)	NM_004364	12	5'-CTCATGGGGGTCTGCTGTAG-3'	5'-GCAAATCGTGCCTTGTCTAT-3'
<i>FABP4</i> (h)	NM_001442	72	5'-CCTTTAAAAATACTGAGATTTCCTTCA-3'	5'-GGACACCCCCATCTAAGGTT-3'
<i>LPL</i> (h)	NM_000237	25	5'-ATGTGGCCCGGTTTATCA-3'	5'-CTGTATCCCAAGAGATGGACATT-3'
<i>LEP</i> (h)	NM_000230	25	5'-TTGTCACCAGGATCAATGACA-3'	5'-GTCCAAACCGGTGACTTTCT-3'
<i>SLC2A4</i> (h)	M20747.1	67	5'-CTGTGCCATCCTGATGACTG-3'	5'-CGTAGCTCATGGCTGGAAC-3'
<i>UCP1</i> (h)	NM_021833	1	5'-GGACACCTTTATACCTAATAACACTGG-3'	5'-CTGGACACGGCCAAAGTC-3'
<i>CELF1</i> (h)	NM_006560	16	5'-TTGGACCCAGTATTTAGCACT-3'	5'-CTGCTCAGGGTGTGAGGTT-3'
<i>RB1</i> (h)	NM_000321.2	2	5'-CAGAATAATCACACTGCAGCAGATA-3'	5'-CACGCGTAGTTGAACCTTTTT-3'
<i>CCND1</i> (h)	NM_053056	67	5'-GACCTCCTCCTCGCACTTCT-3'	5'-GAAGATCGTCGCCACCTG-3'
<i>CCND3</i> (h)	NM_001760	89	5'-AGCGCTGCTCCTCACATAC-3'	5'-GGAGATCAAGCCGCACAT-3'
<i>TP53</i> (h)	NM_000546.4	58	5'-AACATCTCGAAGCGCTCAC-3'	5'-CCCCAGCCAAAGAAGAAAC-3'
<i>CDKN1A</i> (h)	NM_000389.3	82	5'-CGAAGTCAGTTCTTGTGGAG-3'	5'-CATGGGTTCTGACGGACAT-3'
<i>FTO</i> (h)	NM_001080432.2	59	5'-TCTGACCCCCAAAGATGATG-3'	5'-TCACTCATCCAGACACAGGG-3'
<i>POLR2A</i> (h)	NM_000937	69	5'-GCATCATGAACAGCGATGAG-3'	5'-TCATCCATCTTGTCCACCAC-3'
<i>Lmna</i> (m)	NM_019390	78	5'-ATCCGCATTGACAGCCTCT-3'	5'-TCCAGGTCACGCAGCTTT-3'
<i>Pparg</i> (m)	NM_011146.3	7	5'-GAAAGACAACGGACAAATCACC-3'	5'-GGGGGTGATATGTTTGAACCTTG-3'
<i>Cebpb</i> (m)	NM_009883.3	102	5'-TGATGCAATCCGGATCAA-3'	5'-CACGTGTGTTGCGTCAGTC-3'
<i>Cebpa</i> (m)	NM_007678.3	67	5'-AAACAACGCAACGTGGAGA-3'	5'-GCGGTCATTGTCACTGGTC-3'
<i>Lpl</i> (m)	NM_008509.2	25	5'-GCTGGTGGGAAATGATGTG-3'	5'-TGGACGTTGTCTAGGGGGTA-3'
<i>Lep</i> (m)	NM_008493.3	93	5'-CAGGATCAATGACATTTACACA-3'	5'-GCTGGTGAGGACCTGTTGAT
<i>Slc2a4</i> (m)	NM_009204.2	5	5'-GACGGACACTCCATCTGTTG-3'	5'-GCCACGATGGAGACATAGC-3'
<i>G6pdx</i> (m)	NM_008062.2	78	5'-GAAAGCAGAGTGAGCCCTTC-3'	5'-CATAGGAATTACGGGCAAGA-3'
<i>Rn18s</i> (m)	NR_003278.1	74	5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3'	5'-TACAGGGCCTCGAAAGAGTC-3'

\*, Universal Probe Library, Roche. (h), humano; (m), murino

### 3.2.4.3. Cultivo de células

#### 3.2.4.3.a. Explantes primarios

Para obtener los cultivos primarios de fibroblastos humanos a partir de las biopsias de piel, se colocaron los explantes en placas de cultivo de 60 mm (BD Falcon™) con medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) de Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA), suplementado con 30% de suero fetal bovino (FBS) de Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA) y gentamicina 50µg/ml; se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda de CO2 5% en un Water-Jacket CO2 Incubator (NuAire, Plymouth, MN, USA) hasta obtener suficientes fibroblastos, según los protocolos descritos en el manual de Freshney, 2000 (Capítulo 11. Primary Culture, p.149-175) [433].

#### 3.2.4.3.b. Condiciones de Cultivo, subcultivo y conservación

Los cultivos primarios obtenidos, así como la línea celular murina de preadipocitos 3T3-L1 fueron cultivados en el medio DMEM, suplementado con 10% de FBS y gentamicina 50µg/ml, en placas de cultivo de 100 mm (BD Falcon™) (en placas de 6 ó 12 pocillos para los experimentos *in vitro*). El medio de cultivo fue renovado cada 2 días.

Las células fueron sub-cultivadas durante la fase logarítmica del cultivo, siguiendo los criterios descritos en el manual de Freshney, 2000 (Capítulo 12. Cell Lines, p.177-193) [433]. Se utilizó tripsina (TrypLE™ Express Stable Trypsin-like Enzyme, with Phenol Red, Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y se incubó de 3-5 min. a 37 °C, para despegar y disociar la monocapa de células. Esta monocapa posteriormente se resuspendió en medio DMEM y se repartió en otras placas (1:2 a 1:3 a partir de cultivos primarios ó 1:10 a 1:15 a partir de la línea celular 3T3-L1).

Para conservar las células, se preparó una suspensión de alta densidad a partir del cultivo en fase logarítmica tardía y se congeló lentamente con el conservante DMSO, en nitrógeno líquido, donde se mantuvieron hasta su utilización, siguiendo el protocolo descrito en el manual de Freshney, 2000 (Capítulo 19. Cryopreservation. p.297-308 [433]).

#### *3.2.4.3.c. Diferenciación de preadipocitos*

Después de alcanzar confluencia, los preadipocitos murinos 3T3-L1 fueron incubados con medio de diferenciación: DMEM con FBS 10%, insulina 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , dexametasona 0.25  $\mu\text{M}$  y 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 0.1mM según describen Parpal y colaboradores en 2001 [434], en presencia o no de pioglitazona 10  $\mu\text{M}$ , durante 3 días. A continuación se incubaron con DMEM + FBS 10% e insulina 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , con o sin pioglitazona 10  $\mu\text{M}$ , durante dos días más. Finalmente, se volvieron a incubar, con el medio basal de crecimiento hasta obtener más del 50% de las células diferenciadas (generalmente en 2 días más).

#### *3.2.4.3.d. Tinción con rojo oleoso*

Para visualizar mejor las gotas de lípidos de las células 3T3-L1 diferenciadas se utilizó la tinción con rojo oleoso. Las células se fijaron durante 1 h a temperatura ambiente con formalina al 10% en tampón isotónico, luego fueron lavadas tres veces con agua destilada y teñidas con solución de rojo oleoso (0.6% peso/volumen en isopropanol 60%, agua 40%) durante 1 h a 22 °C. Finalmente se lavaron exhaustivamente con agua destilada y se examinaron al microscopio óptico [435].

#### *3.2.4.3.e. Recogida de las células*

Las células que iban a ser analizadas después del cultivo, se tripsinizaron y recogieron en 1mL de PBS, luego fueron precipitadas por centrifugación a 12000 g durante 15min. a 4° C y almacenadas a -30 °C hasta ser procesadas.

### 3.2.5. BASES DE DATOS Y PROGRAMAS ELECTRÓNICOS

Para la realización del presente trabajo se utilizaron las siguientes bases de datos y programas electrónicos disponibles *on line*:

Bases de datos/Programas	Dirección del sitio electrónico
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed</a>
Entrez Gene	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Gene/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Gene/</a>
Entrez Protein	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Protein/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Protein/</a>
Entrez SNP	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/</a>
Entrez OMIM	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM/</a>
Entrez Nucleotide	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Nucleotide/</a>
Programa "PolyPhen-2"	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/</a>
Programa "NetGene2"	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/</a>
Bases de datos de mutaciones	<a href="http://www.dmd.nl">http://www.dmd.nl</a>
	<a href="http://www.uniprot.org/uniprot">http://www.uniprot.org/uniprot</a>
RCSB Protein Data Bank (PDB)	<a href="http://www.rcsb.org/pdb">http://www.rcsb.org/pdb</a>

### 3.2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se muestran como la media  $\pm$  la desviación estándar. Para comprobar si las variables analizadas seguían una distribución gaussiana se utilizó el test de Shapiro-Wilk. Para las comparaciones entre muestras independientes se emplearon el test de la T-Sudent o el test de Mann-Whitney. Para comparaciones "a posteriori" se utilizó el test de Scheffe. Las variables cualitativas se analizaron mediante el test de Chi-Cuadrado. Los diferentes análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa SPSS Statistics v20.0.0 (Chicago, IL, USA).

# **RESULTADOS**





## 4. RESULTADOS

### 4.1. SECUENCIACIÓN DE LOS GENES *LMNA* Y *PPARG*

#### 4.1.1. PREVALENCIA DE MUTACIONES

De los 89 pacientes con sospecha de FPLD estudiados, se detectaron mutaciones en 28, lo que supone el 31% de la muestra: veintiséis fueron portadores de mutaciones en el gen *LMNA* (un 29% del total de la muestra) y 2 de mutaciones en *PPARG* (un 2% del total de la muestra) (ver Tablas 4.1 y 4.9).

##### 4.1.1.1. Mutaciones encontradas en *LMNA*

En el gen *LMNA* se detectaron 6 mutaciones diferentes, 2 de ellas no descritas anteriormente (Tabla 4.1). Una tercera mutación (T528M) fue descrita con anterioridad pero en heterocigosis compuesta [436] [437].

Tabla 4.1: Descripción de las mutaciones encontradas en *LMNA*.

Mutación	Cambio	Exón	Frecuencia*	BD-ID	Referencia
R482W	CGG > TGG	8	15	LMNA_00011	Shackleton <i>et al.</i> [326]
C591F	TGC > TTC	11	2	LMNA_00228	ND
I299V	ATC > GTC	5	4	LMNA_00227	ND
T528M	ACG > ATG	9	2	LMNA_00106	Savage <i>et al.</i> [436]
R545H	CGC > CAC	10	1	-	Huong [438]
R482Q	CGG > CAG	8	2	LMNA_00010	Cao <i>et al.</i> [2]

\*, número de pacientes con la mutación; BD-ID, número de identificación de la variante en la base de datos (<http://www.dmd.nl/>); ND, no descrita.

Tabla 4.2: Análisis predictivo de patogenicidad de las mutaciones puntuales encontradas en *LMNA*, mediante el programa "PolyPhen-2" (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

Mutación	Predicción	Puntuación *
R482W	Probablemente perjudicial	0.998
C591F	Posiblemente perjudicial	0.597
I299V	Benigna	0.009
T528M	Probablemente perjudicial	1.00
R545H	Posiblemente perjudicial	0.936
R482Q	Benigna	0.272

\*, valor máximo 1.00.

#### 4.1.1.1.A. Mutación R482W

La mutación R482W fue detectada en 15 pacientes estudiados, con características clínicas de FPLD2 clásica, pertenecientes a 7 pedigrís diferentes (Tabla 4.3).

La mutación R482W consiste en un cambio heterocigótico de C por T, en la posición 1444 del gen *LMNA* que origina una sustitución de arginina por triptófano en el residuo 482 (R482W) de la proteína.

Tabla 4.3: Pedigrís con la mutación R482W.

Pedigrí	No. de pacientes *	Procedencia
L.1♣	22//14	Sama de Langreo (Asturias)
L.2	2//2	Sama de Langreo (Asturias)
L.3	3//2	Huelva
L.4	2//2	Huelva
L.5	5//5	Huelva
L.6	3//2	Huelva
L.7	1//1	Salamanca
L.8	1//1	Texas

\*, Estudiados genéticamente//mutados; ♣, estudiado anteriormente por nuestro grupo (Araujo *et al.* 2003 [341]).

#### Pedigrí L.1, *LMNA* R482W

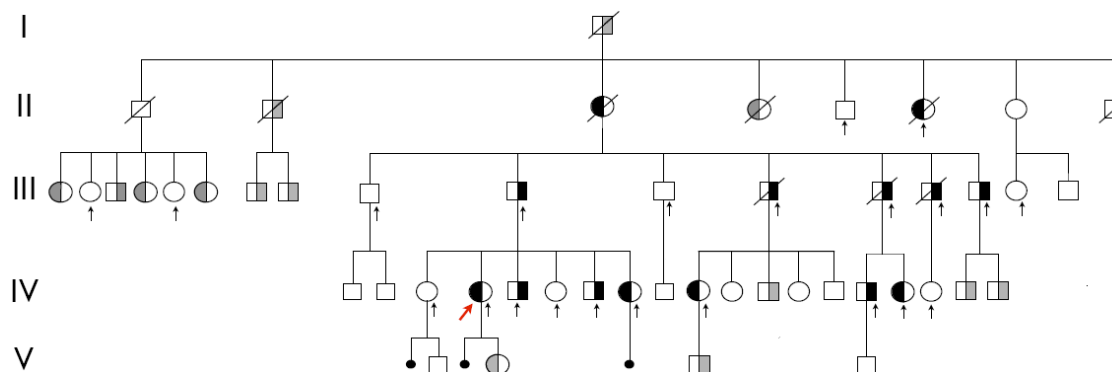


Figura 4.1: Pedigrí L.1 con FPLD2 típica debido a la mutación R482W. Los cuadrados y los círculos representan a los individuos del sexo masculino y femenino, respectivamente. Los individuos afectados se indican con símbolos rellenos de negro, con la flecha en rojo se indica al propositus. Los sujetos no afectados se indican con símbolos en blanco, aquellos cuyo fenotipo da lugar a sospechar que presentan la mutación, con símbolos rellenos de gris. Los individuos a los que se les realizó estudio genético están indicados con una flecha en negro. Los círculos y cuadrados con una barra diagonal son individuos fallecidos. Los puntos negros indican la ocurrencia de aborto. (Actualizado de Araujo *et al.* 2003 [341])

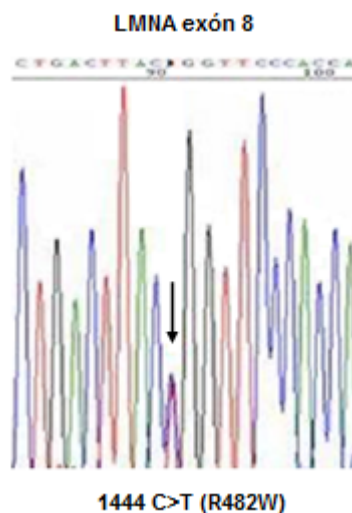


Figura 4.2: Estudio genético del propositus en el pedigrí L.1. Electroferograma de la secuencia de ADN que muestra el cambio heterocigótico de C por T en la posición 1444 (exón 8) del gen *LMNA*, suponiendo una sustitución R482W en la proteína. La mutación se muestra como dos picos superpuestos (indicados con una fecha).



Figura 4.3: Vista anterior, posterior y lateral de la primera paciente diagnosticada con la mutación *LMNA* R482W en el pedigrí L.1, asociada con FPLD2 típica. Muestra pérdida de grasa subcutánea fundamentalmente en extremidades superiores, inferiores y nalgas, acúmulo de grasa en cara y sotabarba, hipertrofia muscular y flebomegalia).

**Pedigrí L.2, LMNA R482W**

En una paciente de 20 años de edad, procedente de Asturias, se detectó la presencia de la mutación R482W, que posteriormente fue encontrada también en su progenitor (Figura 4.5). Esta paciente presentó una distribución atípica de la grasa (pérdida de tejido adiposo subcutáneo en la región abdominal y extremidades, acumulación de grasa en la cara y cuello), acantosis nígricans, hipertrofia muscular y flebomegalia en extremidades inferiores (Figura 4.4) e hipoleptinemia.

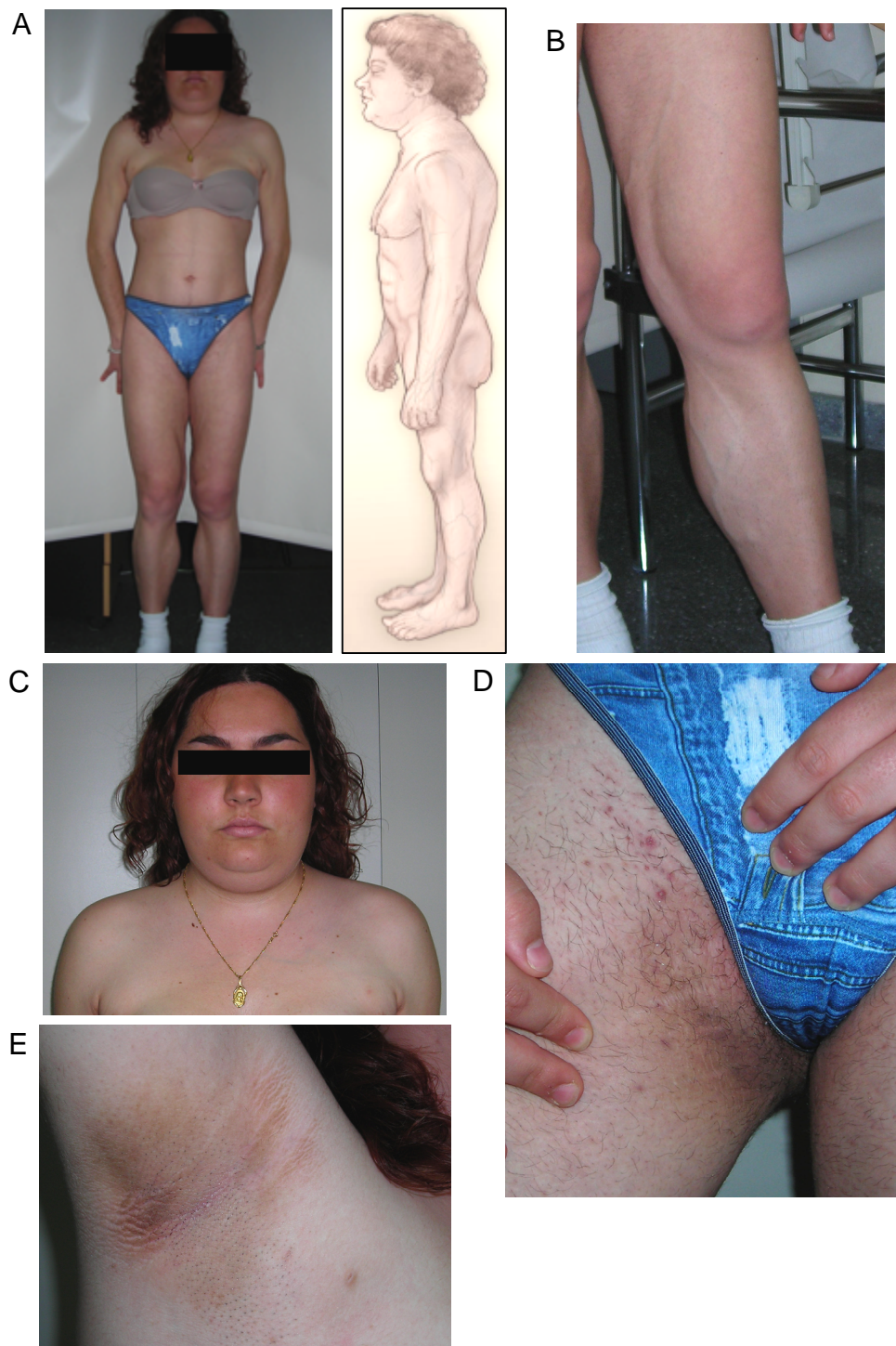


Figura 4.4: Propositus del pedigrí L.2. Mutación *LMNA* R482W, asociada con FPLD2 típica. A: Se observa una marcada pérdida de tejido adiposo subcutáneo en la región abdominal y extremidades, aspecto musculoso sobre todo en miembros inferiores. B: Flebomegalia e hipertrofia muscular. C: Exceso de grasa en la cara y el cuello. D y E: Acanthosis nigricans en ingles y axilas, respectivamente. (Cortesía de la Dra. María Jesús Díaz, Hospital Central de Asturias)

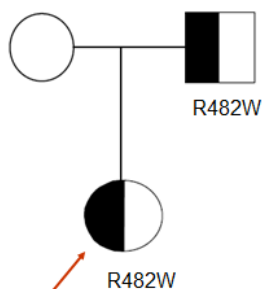
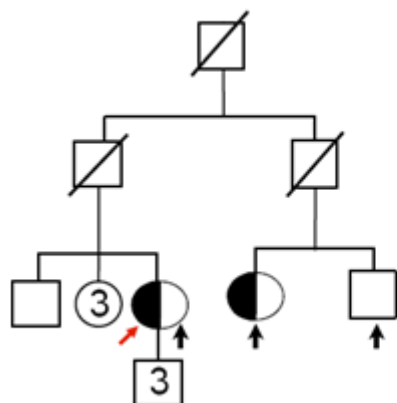


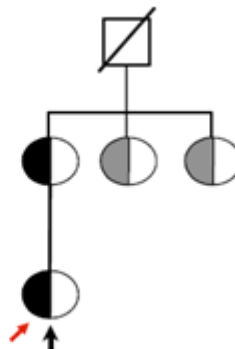
Figura 4.5: Pedigrí L.2 de la familia con FPLD asociada a la mutación R482W, procedente de Sama de Langreo (Asturias). Los cuadrados y los círculos representan a los individuos del sexo masculino y femenino, respectivamente. Con la flecha se indica el primer individuo diagnosticado.

### Pedigrís L.3, L.4, L.5 y L.6 de Huelva, *LMNA* R482W

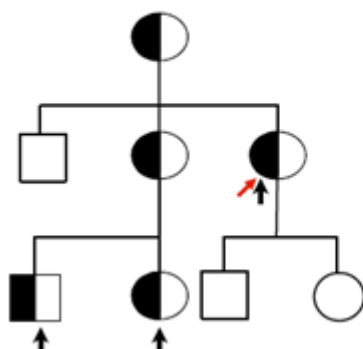
**L.3**



**L.4**



**L.5**



**L.6**

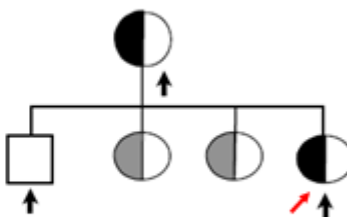


Figura 4.6: Pedigrís de las familias de Huelva con la mutación R482W. Los cuadrados y los círculos representan a los individuos del sexo masculino y femenino, respectivamente. Con la flecha en rojo se indica el primer individuo diagnosticado. Los individuos a los que se les realizó estudio genético están indicados con una flecha en negro. Los mutantes se indican con símbolos rellenos de negro. Los sujetos no afectados se indican con símbolos en blanco, aquellos cuyo fenotipo da lugar a sospechar que presentan la mutación, con símbolos rellenos de gris. Los cuadrados con una barra diagonal son individuos fallecidos. Los números dentro de los símbolos indican el número de hijos.



Figura 4.7: Vista anterior y posterior de la primera paciente diagnosticada con la mutación *LMNA* R482W en el pedigrí L.5, asociada con FPLD2 típica. Muestra pérdida de grasa subcutánea en tronco y extremidades (con ligera hipertrofia muscular y flebomegalia). Se observa ligera acumulación de grasa en espalda. (Foto cortesía del Dr. Francisco Fernández del Hospital Puerta de Europa de Huelva)

### **Pedigrí L7, *LMNA* R482W**

En una paciente con diagnóstico clínico de FPLD a los 10 años, fenotipo característico: pérdida de tejido adiposo subcutáneo en extremidades y exceso de grasa en la cara y cuello, acantosis nigricans (Figura 4.8), intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, así como hipoleptinemia, se encontró la mutación *LMNA* R482W (Figura 4.9).



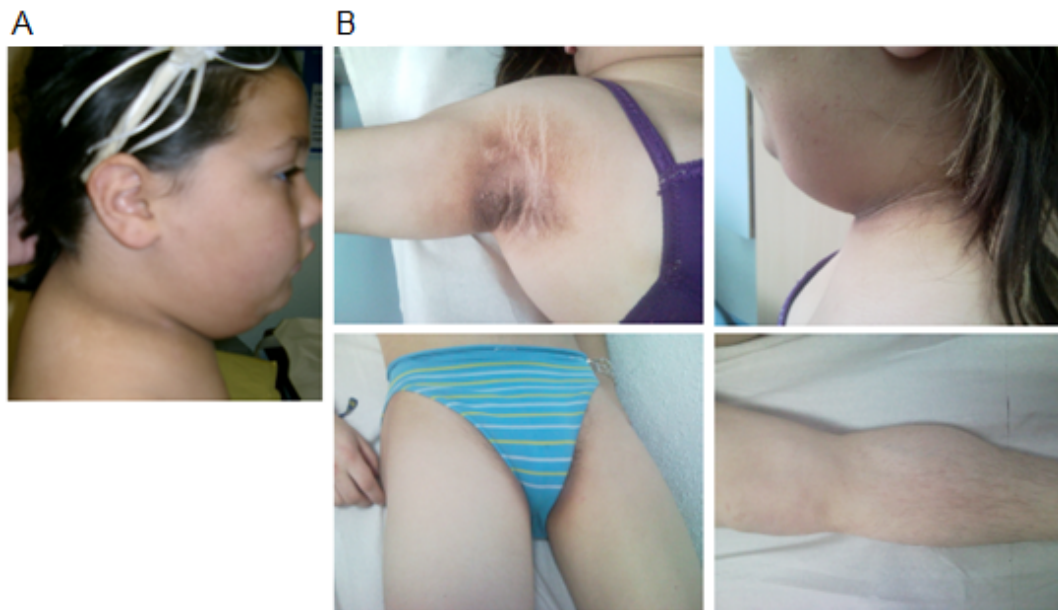


Figura 4.8 Paciente diagnosticada con la mutación *LMNA* R482W asociada con FPLD2 típica, (pedigrí L.7). A: A los 10 años de edad, se observa notable acumulación de grasa en la cara y el cuello (con acantosis nigricans en cuello). B: A los 15 años de edad presenta: marcada acantosis nigricans en axilas, ingles y cuello, exceso de grasa en la cara; pérdida de tejido adiposo subcutáneo en extremidades inferiores, flebomegalia e hipertrofia muscular. (Cortesía del Dr. Pablo Prieto, Hospital Universitario de Salamanca).

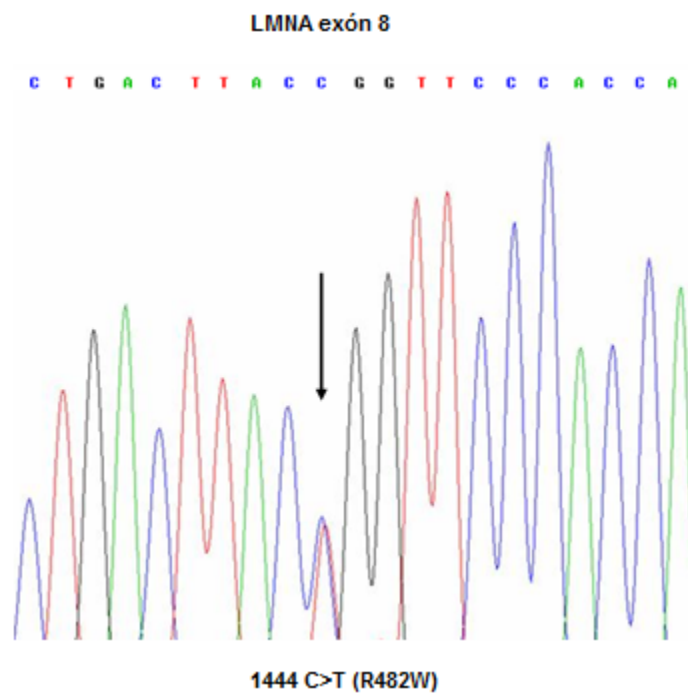


Figura 4.9: Estudio genético de la paciente diagnosticada (pedigrí L.7). Electroferograma de la secuencia de ADN que muestra el cambio heterocigótico de C por T en la posición 1444 (exón 8) del gen *LMNA*, suponiendo una sustitución R482W en la proteína. La mutación se muestra como dos picos superpuestos (indicados con una flecha).



#### 4.1.1.1.B Mutación C591F

##### Pedigrí L9

En una de las pacientes estudiadas con sospecha de lipodistrofia, que mostraba distribución atípica de la grasa, resistencia a la insulina, estenosis aórtica severa y miocardiopatía hipertrófica, se encontró una mutación no descrita en *LMNA*. La paciente tiene un hijo de 11 años con la misma mutación, que no presentaba aún lipodistrofia pero sí una incipiente enfermedad aórtica. En ambos, madre e hijo, la secuenciación del gen *LMNA* reveló que portaban, en heterocigosis, la mutación de sentido equivocado c.1772G > T en el exón 11, que causa la sustitución de cisteína por fenilalanina en el residuo 591 (C591F) (Figuras 4.10 y 4.11). La mutación C591F no había sido descrita anteriormente.

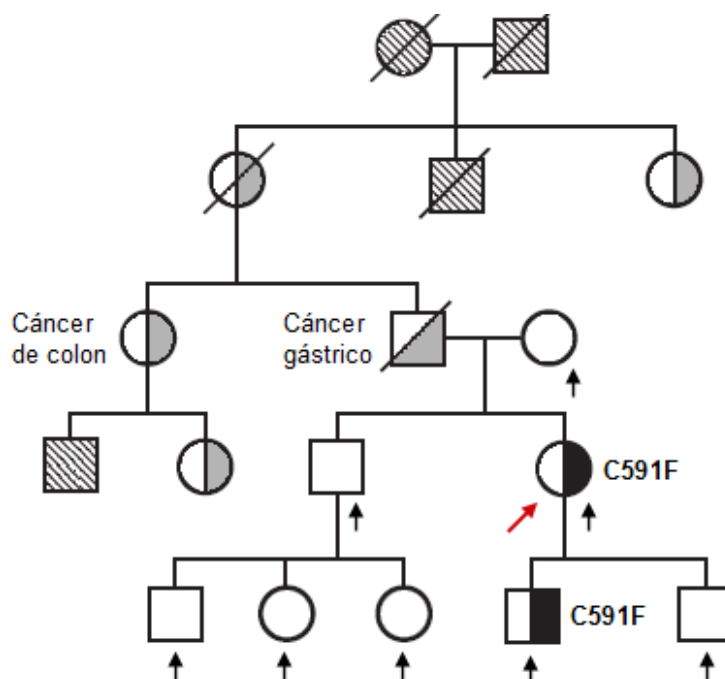


Figura 4.10: Pedigrí L.9 con la mutación C591F, procedente de Galicia (Ribeira, A Coruña), con 8 miembros estudiados (indicados con una flecha en negro), de los que 2 resultaron portadores de la mutación. Los cuadrados y los círculos representan a los individuos del sexo masculino y femenino, respectivamente. Los individuos afectados se indican con símbolos rellenos de negro, con la flecha en rojo se indica el primer individuo diagnosticado. Los sujetos no afectados se indican con símbolos en blanco, aquellos cuyo fenotipo da lugar a sospechar que presentan la mutación, con símbolos rellenos en gris; a los miembros de la familia de los que no se dispone información se indican con símbolos a rayas. Los círculos y cuadrados con una barra diagonal son individuos fallecidos.

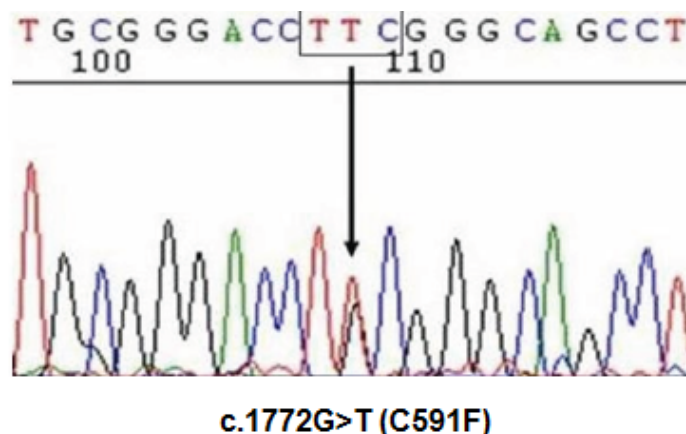


Figura 4.11: Estudio genético del primer sujeto diagnosticado en el pedigrí L.9. Análisis de la secuencia de ADN comprendida entre los codones 588-594 de *LMNA* que muestra el cambio heterocigótico de G por T en la posición 1772 (exón 11) del gen que supone la sustitución C591F en la proteína.

#### *LMNA* C591F

Humana	551	EDDEDEDGDDLHHHHGSHGSSSGDPAEYNLRSRTVLCGT <b>C</b> GQPADKASA	600
Cerdo	551	EDDEDEDGDDLHHHHGSHGSSSGDPAEYNLRSRTVLCGT <b>C</b> GQPADKASA	600
Rata	554	-DDEEEDGDELLHHHRGSHGSSSGDPAEYNLRSRTVLCGT <b>C</b> GQPADKASA	602
Ratón	554	-EDEEEDGEELLHHHRGSHGSSSGDPAEYNLRSRTVLCGT <b>C</b> GQPADKASA	601
Pollo	552	DDDEDEEDDEvHhHHHSGSSSADPAEYNLRSRTVLCGT <b>C</b> GQPADKGS	602
Rana	548	-DEDEDNDMEHHHHHHhSSGDPGEYNLRSRTIVCT <b>S</b> GRPAEKS --	600

Figura 4.12: Región polipeptídica alrededor de la mutación C591F detectada en nuestros pacientes. Comparación de esta región de las laminas tipo A entre diferentes especies: humanos (*Homo sapiens*), cerdo (*Sus scrofa*), rata (*Rattus norvegicus*), ratón (*Mus musculus*), pollo (*Gallus gallus*) y rana (*Xenopus laevis*). El residuo aminoacídico 591 se conserva entre las 6 especies estudiadas.

En las Figuras 4.13 y 4.14 y Tabla 4.4 se muestran las características clínicas, antropométricas y de composición corporal, así como parámetros bioquímicos y metabólicos de la paciente *LMNA* C591F.

Tanto el examen físico como la medición de los pliegues cutáneos mostró una notable pérdida de tejido adiposo subcutáneo en extremidades y un exceso de grasa en tronco (Figura 4.13 y 4.14). La paciente no mostraba hipertrofia muscular, tampoco presentaba hirsutismo o acantosis nigricans.

El índice de sensibilidad a la insulina  $S_I$  calculado a través del modelo mínimo de Bergman y expresado en  $E-5 \text{ min}^{-1} (\text{pmol/l})^{-1}$ , fue igual a 1.6, un valor que está por debajo del rango de normalidad de nuestra población (4.6 -17.4) [243].

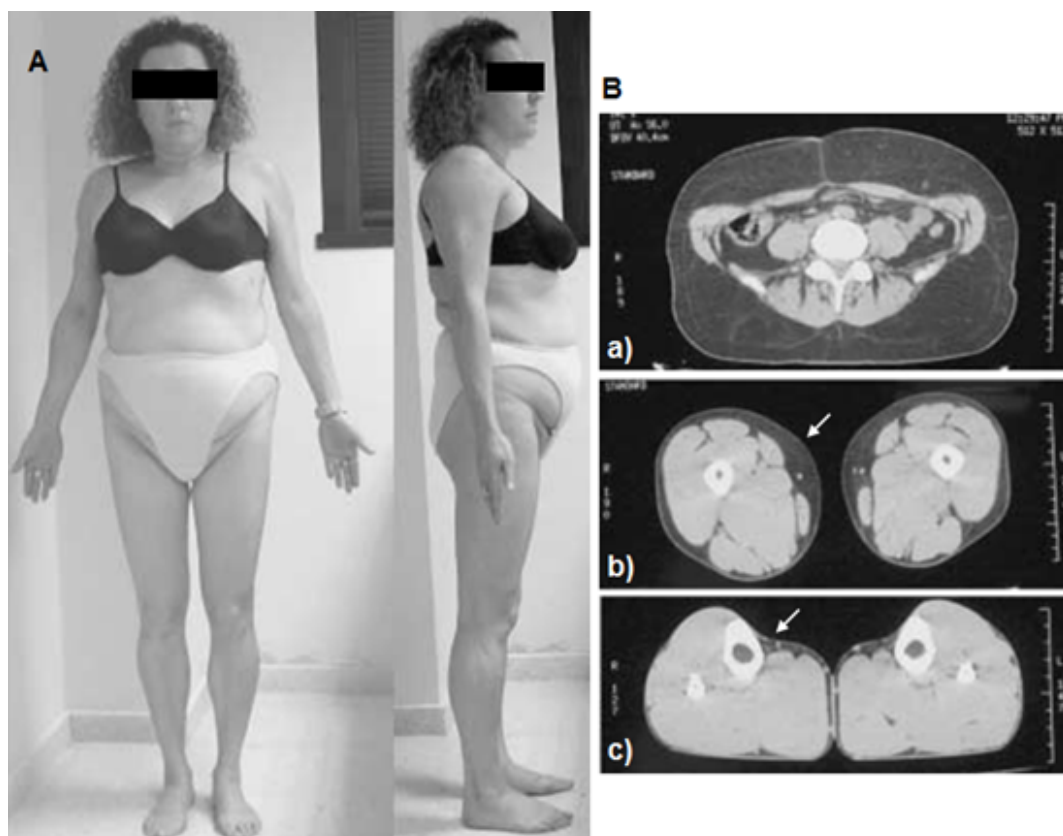


Figura 4.13: A: Vista anterior y lateral de la paciente con la mutación *LMNA* C591F asociada con FPLD2 atípica. Muestra pérdida de grasa subcutánea en brazos y piernas, sin la presencia de músculos prominentes o flebomegalia. Presenta además exceso de grasa evidente en cara, barbilla y cuello, región supraclavicular, área dorso-cervical, espalda, abdomen y en las partes medias de la zona proximal de los muslos debajo del ligamento inguinal. B: Imágenes de cortes transversales, obtenidas por tomografía axial computarizada, de la paciente a nivel de la vértebra L5 (a), de la mitad del muslo (b) y la pantorrilla (c) que reflejan una mínima grasa subcutánea rodeando los músculos de muslos y pantorrillas (indicado por flechas). A nivel de la vértebra L5, se observa abundante grasa subcutánea respecto a la grasa intra-abdominal visceral.

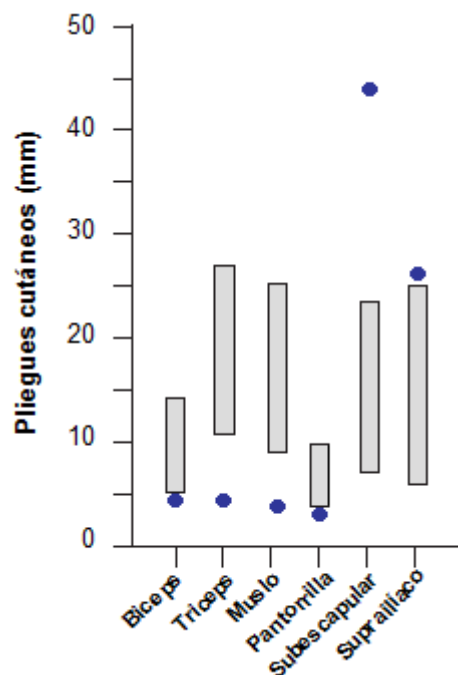


Figura 4.14: Pliegues cutáneos de varias regiones anatómicas de la mujer portadora de la mutación C591F en *LMNA* (círculos azules). Las barras grises representan los valores de percentil  $P_{10}$  y  $P_{90}$  de mujeres sanas con edad similar, según se describe en: Garg *et al.*, 2001 [339] y Araujo *et al.*, 2003 [341]).

Tabla 4.4: Características del propositus en el pedigrí L.9 con FPLD2 asociada a la mutación LMNA C591F.

	Genotipo C591F	Rango de normalidad
<i>Antropometría y composición corporal</i>		
Sexo (M/F)	F	-
Edad (años)	32	-
Talla (cm)	159	-
Peso (kg)	60	-
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	23.54	18 - 25
WHR	1.1	0.68 - 0.83
% Grasa total*	24.9	30.3 ± 1.5
% Grasa tronco*	25.2	29.0 ± 1.6
% Grasa EESS*	25.1	30.2 ± 1.8
% Grasa EEII*	23.4	33.1 ± 1.5
<i>Parámetros bioquímicos y del metabolismo de la glucosa</i>		
Glucosa basal (mg/dL)	88	74 - 105
Insulina basal (mUI/L)	15	1.5 - 18.5
Hemoglobina A1C (%)	4.4	3.9 - 6.1
Leptina (ng/ml)	2.5	3.3 - 39.7
Colesterol total (mg/dL)	141	120 - 254
Triglicéridos (mg/dL)	97	25 - 150
Colesterol LDL (mg/dL)	76	80 - 140
Colesterol HDL (mg/dL)	38	35 - 84
IL-6 (pg/ml)	13.6	0.0 - 5.0
TNF-alfa (pg/m)	15.1	0.0 - 8.1
Índice S <sub>I</sub> (E-5(1/(min(pmol/l)))	1.6	4.6 - 17.4
<i>Aspectos clínicos</i>		
Inicio de lipoatrofia	13 años	
Patología asociada	Miocardiopatía hipertrófica, estenosis aórtica severa, hipoleptinemia, polimenorrea	

IMC, índice de masa corporal \*, WHR, "Waist-hip ratio" (Índice cintura-cadera); % de grasa corporal determinado por DEXA; EESS, extremidades superiores; EEII, extremidades inferiores; Hemoglobina A1c, hemoglobina glicosilada.

#### 4.1.1.1.C. Mutación I299V

##### **Pedigrí L10**

En otra de las pacientes estudiadas (G1), que mostraba distribución atípica de la grasa, hipertrofia muscular en pantorrillas (Figura 4.15), diabetes mellitus, hipertensión arterial, hiperlipidemia e hipoleptinemia (Tabla 4.5), se encontró una mutación en heterozigosis no descrita, localizada en el exón 5 de *LMNA*. Esta mutación consiste en una sustitución de A por G en la posición 895 que supone el cambio de isoleucina por valina en el residuo 299 (I299V) de la proteína (Figura 4.16). El posterior estudio de algunos familiares de primer grado de la paciente reveló que esta mutación se segrega con un fenotipo FPLD (Figura 4.18).



Figura 4.15: Vista anterior y posterior de la primera paciente diagnosticada con la mutación *LMNA* I299V, asociada con FPLD2 atípica. Muestra pérdida de grasa subcutánea en caderas, región glútea y extremidades inferiores (con hipertrofia muscular y flebomegalia). Se puede apreciar además el exceso de grasa en el tronco, sobre todo en espalda y abdomen.

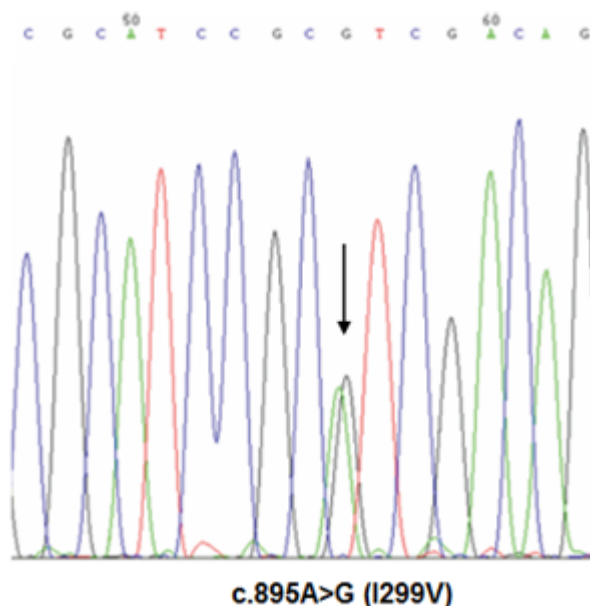


Figura 4.16 Estudio genético del propositus en el pedigrí L.10. Electroferograma de la secuencia de ADN que muestra el cambio heterocigótico de A por G en la posición 895 (exón 5) del gen *LMNA*, suponiendo una sustitución I299V en la proteína. La mutación se muestra como dos picos superpuestos (indicados con una flecha).

#### *LMNA* I299V

Humana*	275	RQSAERNNSNLVGAAHEELQQSRIRIDSLSAQLSQLQKQLAAKEAKLRDLE	324
Ratón	343	RQSAERNNSNLVGAAHEELQQSRIRIDSLSAQLSQLQKQLAAKEAKLRDLE	392
Rata	274	RQSAERNNSNLVGAAHEELQQSRIRIDSLSAQLSQLQKQLAAKEAKLRDLE	323
Pollo	274	KQSAERNSSMAGAAHEELQQTHIRIDSLSAELSQLQKQLAAKEAKLREVE	323
Rana*	271	KQSAERNSSLVGEAQEEIQQSRIRIDSLSAQLSQLQKQLAAREAKLRDLE	320

Figura 4.17: Región polipeptídica alrededor de la mutación I299V detectada en nuestros pacientes. Comparación de esta región de la lamina A entre diferentes especies: humanos (*Homo sapiens*), ratón (*Mus musculus*), rata (*Rattus norvegicus*), pollo (*Gallus gallus*) y rana (*Xenopus laevis*). El residuo aminoacídico I299 se conserva entre las 5 especies estudiadas. \*También se conserva en lamina C.

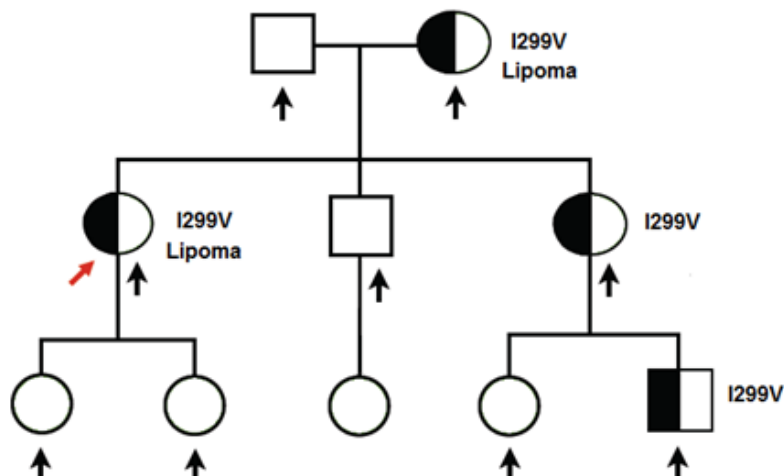


Figura 4.18: Pedigrí L.10 de la familia con FPLD asociada a la mutación I299V, procedente de Galicia (Oza dos Ríos, A Coruña); con 9 miembros estudiados (indicados con una flecha en negro), de ellos 4 portaban la mutación (dos presentaban lipomatosis). Los cuadrados y los círculos representan a los individuos del sexo masculino y femenino, respectivamente. Con la flecha en rojo se indica al propositus. Los mutantes se indican con símbolos rellenos de negro. Los sujetos no afectados se indican con símbolos en blanco.

Las pacientes con esta nueva mutación presentan un fenotipo de lipodistrofia parcial familiar atípico: pérdida de grasa en extremidades y nalgas, acúmulos de grasa en la cara, sotabarba y tronco. Dos de las tres pacientes estudiadas presentan diabetes mellitus insulino-requiriente, una severa resistencia a la insulina, hipoleptinemia e hipertrigliceridemia (Tabla 4.5).



Tabla 4.5: Características de los miembros del pedigrí L.10 con FPLD2 asociada a la mutación LMNA I299V.

	Genotipo I299V		
	G1 (propositus)	G2 (madre)	G3 (hermana)
<i>Antropometría y composición corporal</i>			
Sexo (M/F)	F	F	F
Edad (años)	42	64	38
Talla (cm)	1.63	1.59	1.66
Peso (kg)	85.9	84.4	87.6
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	32.33	33.38	31.79
Cintura (cm)	104.7	106	110
WHR	1.00	1.02	1.00
PC Bicipital (mm)	11	10	15
PC Tricipital (mm)	16.6	5.0	19.0
PC Subescapular (mm)	28.0	36.0	35.0
PC Suprailíaco (mm)	30	30	31
PC Muslo (mm)	5	21	22
PC Pantorrilla (mm)	3.2	5.0	7.0
% Grasa total*	33.6	31.2	35.8
% Grasa tronco*	43.4	38.2	42.2
% Grasa EESS*	27.3	27.9	33.4
% Grasa EEII*	18.3	19.5	29.5
<i>Parámetros bioquímicos y del metabolismo de la glucosa</i>			
Glucosa basal (mg/dL)	168	227	90
Insulina basal (mUI/L)	27.3	30,2	15,5
Hemoglobina A1C (%)	9.1	7.1	5.5
Leptina (ng/ml)	0.9	13	17
HOMA-IR	11.48	17.16	3.49
Colesterol total (mg/dL)	158	155	198
Triglicéridos (mg/dL)	130	198	167
Colesterol LDL (mg/dL)	64	93	133
Colesterol HDL (mg/dL)	28	22	32
IL-6 (pg/ml)	2.1	2.0	2.0
TNF-alfa (pg/m)	36.9	11.7	11.1
<i>Aspectos clínicos</i>			
Inicio de lipoatrofia	Infancia	Adolescencia	15 años
Patología asociada	DM, HTA, HLP IIb, hipoleptinemia lipomatosis	HTA, DM2, HLP IIb, lipomatosis	HLP IV

IMC, índice de masa corporal; WHR, "Waist-hip ratio" (Índice cintura-cadera); PC, pliegue cutáneo; \*, % de grasa corporal determinado por DEXA; EESS, extremidades superiores; EEII, extremidades inferiores; Hemoglobina A1C, hemoglobina glicosilada; HOMA-IR, "homeostasis model assessment-insulin resistance"; DM, diabetes mellitus; HTA, hipertensión arterial; HLP, hiperlipidemia.

#### 4.1.1.1.D. Mutación T528M

##### Pedigrí L11

El análisis genético de una paciente de Málaga, con distribución anormal de la grasa corporal, hipertrofia muscular (Figura 4.19), hepatomegalia, hipertrigliceridemia, hipoleptinemia y TNFalfa aumentado (Tabla 4.6), reveló la presencia de una mutación en heterozigosis en el exón 9 del gen *LMNA*. La mutación consiste en el cambio de C por T en la posición 1583, que origina la sustitución de treonina por metionina en el residuo 528 (T528M) de la proteína (Figura 4.20). La madre y una hermana de la propositus presentan un fenotipo similar. El estudio genético de la hermana reveló que posee la misma mutación (Figuras 4.20 y 4.22). Ambas pacientes con el genotipo T528M portan además: el SNP sinónimo H566H (c. 1698 C>T) en *LMNA*, así como el SNP no sinónimo P12A (c.34 C>G) y SNP sinónimo (en homocigosis) L449L (c.1345 C>T) en el gen *PPARG*, ver sección 4.1.2.

La hermana del propositus presenta hipertensión arterial (HTA), no es diabética y tampoco presenta hiperlipidemia (HLP). La madre, ya fallecida, presentó diabetes mellitus, HTA, HLP tipo IV, xantomas eruptivos, cardiopatía isquémica e ictus.



Figura 4.19: Primera paciente diagnosticada con la mutación T528M asociada a FPLD2. Muestra pérdida de grasa subcutánea en tronco y extremidades (con hipertrofia muscular y flebomegalia), así como, acumulación de grasa en la cara.

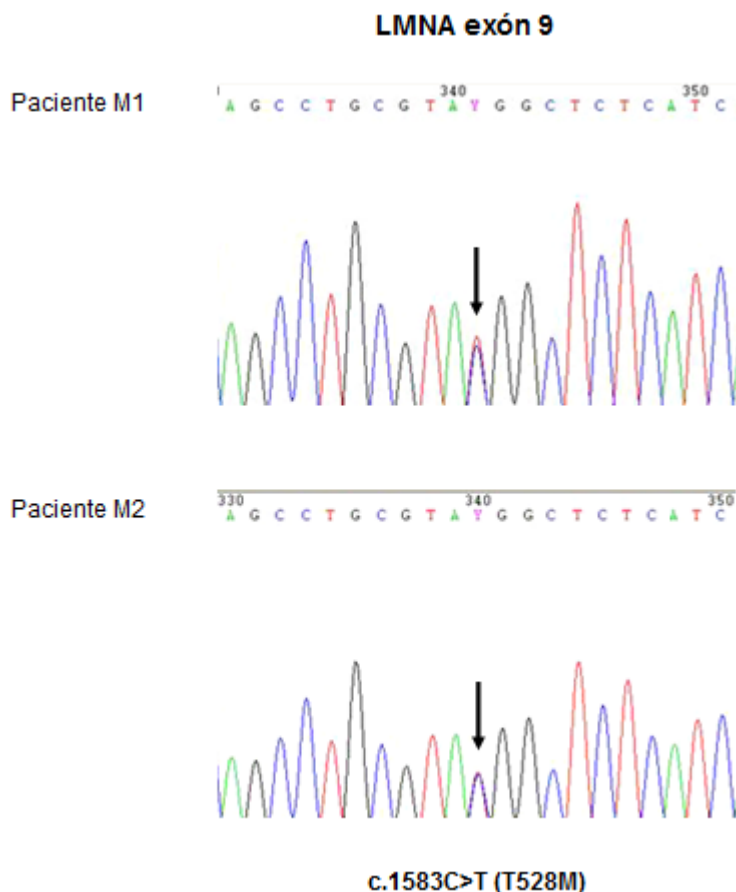


Figura 4.20: Estudio genético en las dos pacientes diagnosticadas en el pedigrí L.11, el propositus (M1) y la hermana (M2). Electroferograma de la secuencia de ADN que muestra el cambio heterocigótico de C por T en la posición 1583 (exón 9) del gen *LMNA*, suponiendo una sustitución T528M en la proteína. La mutación se muestra como dos picos superpuestos (indicados con una flecha).

#### *LMNA* T528M

Humana\* 504 **ATHSPPTDLVWKAQNTWGCNSLR**IALINSTGEEVAMRKLVRSVTVVEDD 553

Ratón 504 **ATHSPPTDLVWKAQNTWGCSS**LRIALINSTGEEVAMRKLVRSLT**MTV** 550

Rata 504 **ATHSPPTDLVWKAQNTWGCSS**LRIALINATGEEVAMRKLVRSLT**MTV** 550

Pollo 505 **ATHSPPSD**VVWKAQSSWGSDSLRIALINSNGEEVAMRKLVRT**VII** 550

Rana\* 501 **ATNSPP**SDLVWKAQSSWGTGDSIRIALLTSSNEEVAMRKLVRT**TVI** 546

Figura 4.21: Región polipeptídica alrededor de la mutación T528M detectada en nuestros pacientes. Comparación de esta región de la lamina A entre diferentes especies: humanos (*Homo sapiens*), ratón (*Mus musculus*), rata (*Rattus norvegicus*), pollo (*Gallus gallus*) y rana (*Xenopus laevis*). El residuo aminoacídico T528 se conserva entre las 5 especies estudiadas. \*, También se conserva en lamina C.

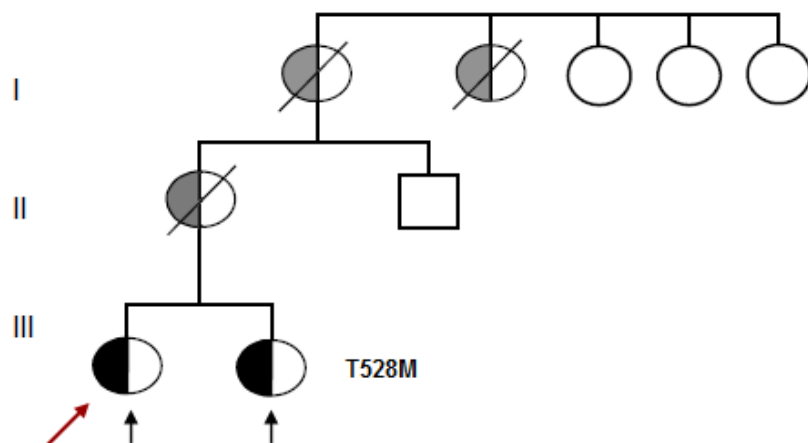


Figura 4.22: Pedigrí L.11 con la mutación T528M, procedente de Andalucía (Málaga), con 2 hermanas estudiadas que portan la mutación. Los cuadrados y los círculos representan a los individuos del sexo masculino y femenino, respectivamente. Los individuos afectados se indican con símbolos rellenos de negro, con la flecha en rojo se indica el primer individuo diagnosticado. Los sujetos no afectados se indican con símbolos en blanco, aquellos cuyo fenotipo da lugar a sospechar que presentan la mutación, con símbolos rellenos en gris. Los círculos y cuadrados con una barra diagonal son individuos fallecidos.

Tabla 4.6: Características del propositus en el pedigrí FPLD2 con la mutación *LMNA* T528M.

	Genotipo T528M	Rango de normalidad
<i>Antropometría y composición corporal</i>		
Sexo (M/F)	F	
Edad (años)	42	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	23.7	21 - 26
WHR	0.9	0.68 - 0.83
PC Bicipital (mm)	4	2.5 - 19.3
PC Tricipital (mm)	5.5	7.7 - 30.8
PC Subescapular (mm)	17.5	5.1 - 24.5
PC Suprailíaco (mm)	9	2.8 - 28.5
PC Muslo (mm)	3.9	19 - 47
PC Pantorrilla (mm)	3.7	5.4 - 21.9
% Grasa total*	21.2	24.3
% Grasa tronco*	26.2	17.4
% Grasa EESS*	15.8	27.7
% Grasa EEII*	14.8	32.8
<i>Parámetros bioquímicos y del metabolismo de la glucosa</i>		
Insulina (mUI/L)	5.9	1.5 - 18.5
Leptina (ng/ml)	2.4	5.5 - 30.0
HOMA-IR	1.24	<3
Triglicéridos (mg/dL)	372	25 - 150
TNF-alfa (pg/ml)	21	0 - 8.1
<i>Aspectos clínicos</i>		
Inicio de lipoatrofia	Infancia	
Patología asociada	Hepatomegalia, enfermedad de Crohn	

IMC, índice de masa corporal; WHR, "Waist-hip ratio" (Índice cintura-cadera); PC, pliegue cutáneo; \*, % de grasa corporal determinado por DEXA; EESS, extremidades superiores; EEII, extremidades inferiores; HOMA-IR, "homeostasis model assessment-insulin resistance".

#### 4.1.1.1.E. Mutación R545H

### Pedigrí L12

En otra de las pacientes estudiadas, procedente de Galicia, con distribución atípica de la grasa: acumulación de grasa en la cara, cuello, tórax y abdomen (Figura 4.23). La paciente presentó diabetes mellitus insulino-requiriente (y antecedentes familiares), acantosis nigricans y acrocordones. En esta paciente se encontró una mutación en heterozigosis, descrita previamente por Huong en 2010 (Tesis Doctoral) [438], en el gen *LMNA*, que consiste en el cambio de G por A en el nucleótido 1634 y supone la sustitución de serina por arginina (R545H) (Figura 4.24).



Figura 4.23: Vista anterior, lateral y posterior de la paciente diagnosticada con la mutación *LMNA* R545H, con distribución atípica de la grasa: acumulación de grasa en la cara, cuello, tórax y abdomen. En la imagen inferior se hace evidente la presencia de la llamada giba de búfalo (en la parte superior de la espalda) y papada.

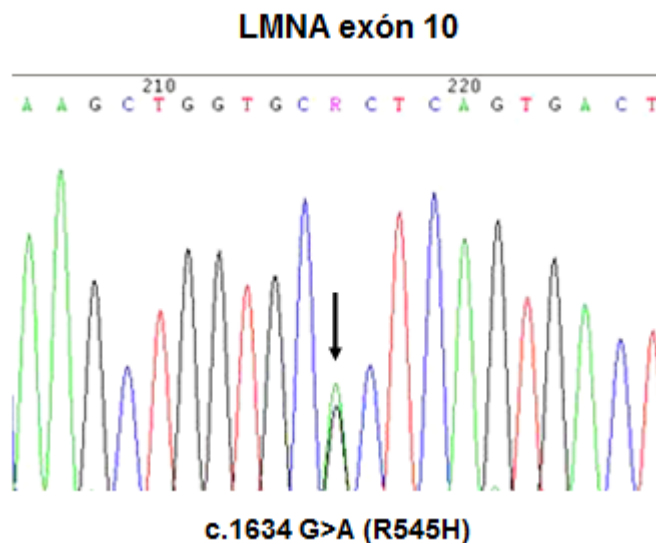


Figura 4.24: Estudio genético en la paciente diagnosticada. Electroferograma de la secuencia de ADN que muestra el cambio heterocigótico de G por A en la posición 1634 (exón 10) del gen *LMNA*, suponiendo una sustitución R545H en la proteína. La mutación se muestra como dos picos superpuestos (indicados con una flecha).

#### *LMNA* R545H

Humana*	520	WGCGNSLRTALINSTGEEVAMRKLVR	SVTV	VEDDEDEDGDDL	LHHH	HGSH	569
Ratón	520	WGCGSSLRTALINSTGEEVAMRKLVR	SLTM	VEDNEDD	DEGEELLHHH	RV	570
Rata	519	WGCGSSLRTALINATGEEVAMRKLVR	SLTM	VEDNDDEE	EDGDELLHHH	RGSH	570
Pollo	521	WGS	GDSLRTALINSNGEEVAMRKLVR	TV	IINDDEDEE	DEVS	570
Rana*	517	WGTGDS	IRTALLTSSNEEVAMRKLVR	TV	VI		546

Figura 4.25: Región polipeptídica alrededor de la mutación R545H detectada en la paciente del pedigrí L.12. Comparación de esta región de la lamina A entre diferentes especies: humanos (*Homo sapiens*), ratón (*Mus musculus*), rata (*Rattus norvegicus*), pollo (*Gallus gallus*) y rana (*Xenopus laevis*). El residuo aminoacídico R545 se conserva entre las 5 especies estudiadas. \*, También se conserva en lamina C.

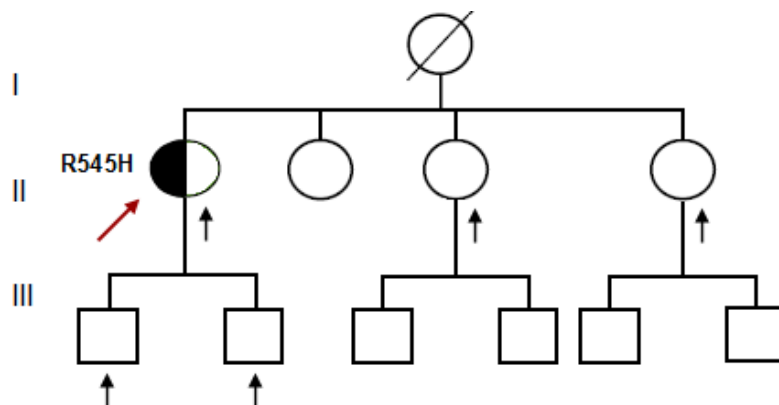


Figura 4.26: Pedigrí L.12 con la mutación R545H, procedente de Galicia (Arzúa, La Coruña), de 5 sujetos estudiados, sólo 1 portaba la mutación. Los cuadrados y los círculos representan a los individuos del sexo masculino y femenino, respectivamente. Los individuos a los que se les realizó estudio genético están indicados con una flecha en negro. Con la flecha en rojo se indica a la paciente diagnosticada. El círculo con una barra diagonal representa a una mujer fallecida.



Tabla 4.7: Características de la paciente portadora de la mutación *LMNA* R545H.

	Genotipo R545H	Rango de normalidad
<i>Antropometría y composición corporal</i>		
Sexo (M/F)	F	
Edad (años)	45	
Talla (cm)	163	
Peso (kg)	81	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	30.50	22 - 27
WHR	1.04	0.68 - 0.83
PC Bicipital (mm)	8	4 - 27
PC Tricipital (mm)	19	10 - 36
PC Subescapular (mm)	28	8 - 50
PC Supraíliaco (mm)	6	10 - 50
PC Muslo (mm)	23	.11 - 55
PC Pantorrilla (mm)	11	.5 - 30
<i>Parámetros bioquímicos y del metabolismo de la glucosa</i>		
Glucosa basal (mg/dL)	268.0	74 - 105
Insulina basal (mUI/L)	10.7	1.5 - 18.5
Hemoglobina A1C (%)	9.9	3.9 - 6.1
Leptina (ng/ml)	12.7	10 - 60
Colesterol total (mg/dL)	203	120 - 254
Triglicéridos (mg/dL)	169	25 - 150
Colesterol LDL (mg/dL)	126	80 - 140
Colesterol HDL (mg/dL)	41	35 - 84
<i>Aspectos clínicos</i>		
Inicio de lipoatrofia	Infancia	
Patología asociada	Artritis reumatoide, Tiroiditis linfocitaria crónica, DM, HTA, HLP IIb, Adenoma suprarrenal productor de cortisol	

IMC, índice de masa corporal; WHR, "Waist-hip ratio" (Índice cintura-cadera); PC, pliegue cutáneo; Hemoglobina A1C, hemoglobina glicosilada; DM, diabetes mellitus; HTA, hipertensión arterial; HLP, hiperlipidemia.

#### 4.1.1.1.F. Mutación R482Q

##### **Pedigrí L.13**

El análisis genético de una paciente de Monforte (Galicia), con FPLD típica (Figura 4.27), reveló la presencia de la mutación heterocigótica R482Q en el exón 8 de *LMNA*. La mutación consiste en el cambio de G por A en la posición 1445, que origina la sustitución de arginina por glutamina en el residuo 482 (R482Q) de la proteína (Figura 4.28). La madre del propositus presenta un fenotipo similar y el estudio genético reveló que posee la misma mutación (Figura 4.29).

A



B



Figura 4.27: Primera paciente diagnosticada con la mutación *LMNA* R482Q en el pedigrí L.13, asociada con FPLD2 típica. A: Se observa una marcada pérdida de tejido adiposo subcutáneo en las extremidades y nalgas, mientras que la grasa subcutánea abdominal es normal, acumulación de grasa en la cara, hipertrofia muscular y flebotomegalia en extremidades inferiores. B: Presenta acantosis nigricans en cuello, axilas e ingles.

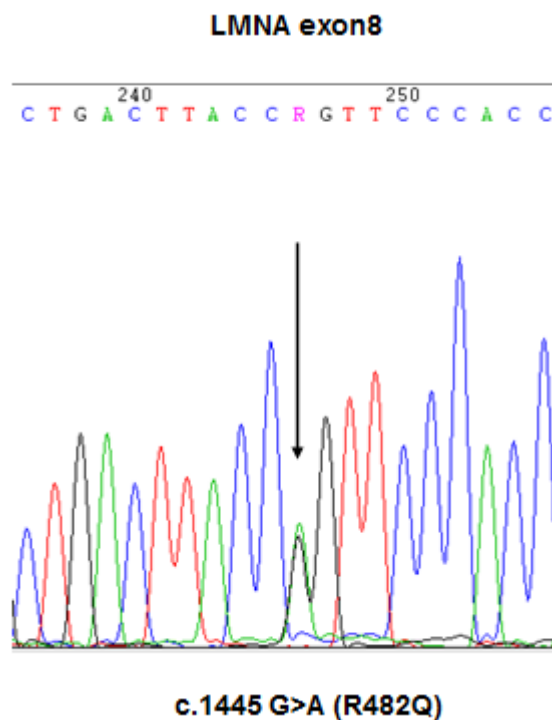


Figura 4.28: Estudio genético en la paciente diagnosticada. Electroferograma de la secuencia de ADN que muestra el cambio heterocigótico de G por A en la posición 1445 (exón 8) del gen *LMNA*, suponiendo una sustitución R482Q en la proteína. La mutación se muestra como dos picos superpuestos (indicados con una flecha).

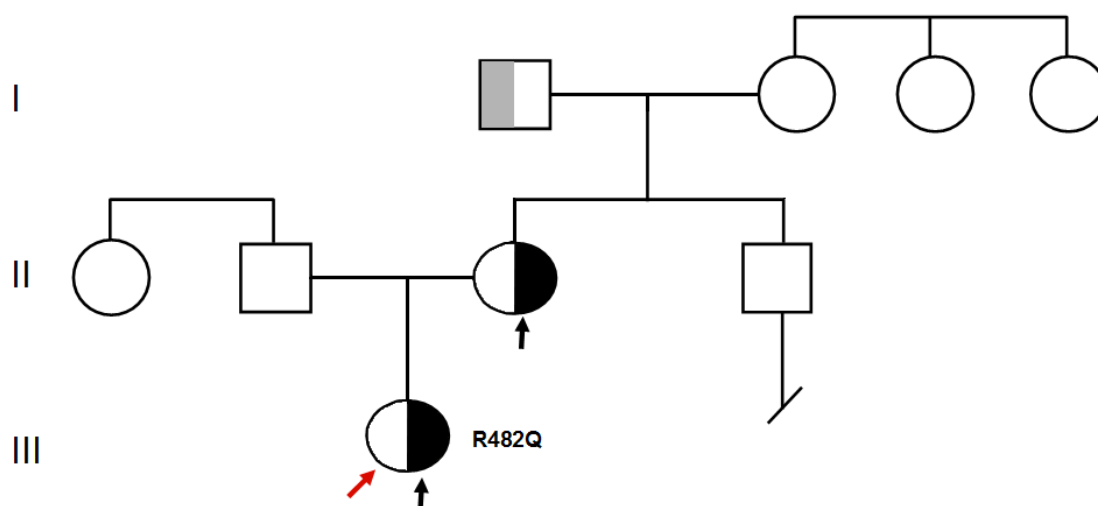


Figura 4.29: Pedigrí L13. con la mutación R482Q, procedente de Monforte (Galicia). Los cuadrados y los círculos representan a los individuos del sexo masculino y femenino, respectivamente. Los individuos afectados se indican con símbolos rellenos de negro, con la flecha en rojo se indica al propositus. Los sujetos no afectados se indican con símbolos en blanco, aquellos cuyo fenotipo da lugar a sospechar que presentan la mutación, con símbolos rellenos en gris.

Tabla 4.8: Características de los miembros del pedigrí L.13 con FPLD2 asociada a la mutación LMNA R482Q.

	Genotipo R482Q	
	G1 (propositus)	G2 (madre)
<i>Antropometría y composición corporal</i>		
Sexo (M/F)	F	F
Edad (años)	22	56
Talla (cm)	1.61	1.56
Peso (kg)	64.5	68.9
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	24.88	28.31
Cintura (cm)	77.2	95.8
WHR	0.87	1.06
PC Bicipital (mm)	4.8	4.8
PC Tricipital (mm)	9.7	7.0
PC Subescapular (mm)	19.8	37.5
PC Suprailíaco (mm)	14.4	10.2
PC Muslo (mm)	4.8	4
PC Pantorrilla (mm)	6	3
% Grasa total*	26.2	28.0
% Grasa tronco*	30.4	35.1
% Grasa EESS*	24.2	24.1
% Grasa EEII*	21.6	17.5
<i>Parámetros bioquímicos y del metabolismo de la glucosa</i>		
Glucosa basal (mg/dL)	102	115
Insulina basal (mUI/L)	11	16.8
Hemoglobina A1C (%)	5.1	6.2
Leptina (ng/ml)	7.5	7.2
HOMA-IR	2.48	4.83
Colesterol total (mg/dL)	191	217
Triglicéridos (mg/dL)	168	157
Colesterol LDL (mg/dL)	141	142
Colesterol HDL (mg/dL)	36	43
IL-6 (pg/ml)	2	ND
TNF-alfa (pg/m)	15.2	ND
<i>Aspectos clínicos</i>		
Inicio de lipoatrofia	Pubertad	Pubertad
Patología asociada	GBA, HLP IV	GBA, HLP IV, HTA, lipomas, Ca mama, BMN

IMC, índice de masa corporal; WHR, "Waist-hip ratio" (Índice cintura-cadera); PC, pliegue cutáneo; \*, % de grasa corporal determinado por DEXA; EESS, extremidades superiores; EEII, extremidades inferiores; Hemoglobina A1C, hemoglobina glicosilada; homa-IR, "homeostasis model assessment-insulin resistance"; GBA, glucemia basal alterada; HLP, hiperlipidemia; HTA, hipertensión arterial; Ca mama, carcinoma de mama; BMN, bocio multinodular.

#### 4.1.1.2. Mutaciones encontradas en *PPARG*

En el gen *PPARG* se detectaron 2 mutaciones diferentes no descritas anteriormente (Tabla 4.9).

Tabla 4.9 Descripción de las mutaciones encontradas en *PPARG*

Mutación	Cambio	Exón	No. de pacientes *
R181Q	CGG > CAG	4	2/1
S410R	AGC > AGA	6	2/1

\*, Estudiados genéticamente//mutados.

Tabla 4.10: Análisis predictivo de patogenicidad de las mutaciones puntuales encontradas en *PPARG*, mediante el programa "PolyPhen-2" (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

Mutación	Predicción	Puntuación *
R181Q	Probablemente perjudicial	1.000
S410R	Probablemente perjudicial	0.997

\*, valor máximo 1.00

#### 4.1.1. 2.A. Mutación *R181Q*

##### Pedigrí P.1

Al secuenciar el gen *PPARG* se detectó en una de las pacientes, procedentes de Galicia, con distribución atípica de la grasa (acumulación de grasa en la cara, tórax, abdomen y extremidades superiores, con escaso TAsc en extremidades inferiores y glúteos) (Figura 4.30), una mutación en heterozigosis no descrita, que consiste en el cambio de G por A en el nucleótido 542, que supone la sustitución de arginina por glutamina (R181Q) (Figura 4.31).



Figura 4.30: Vista anterior y posterior de la paciente diagnosticada con la mutación *PPARG* R181Q, asociada con FPLD2 atípica, mostrando pérdida de grasa subcutánea en caderas, región glútea y piernas (con hipertrofia muscular y flebomegalia). Se puede apreciar además el exceso de grasa en el tronco, sobre todo en espalda y abdomen.

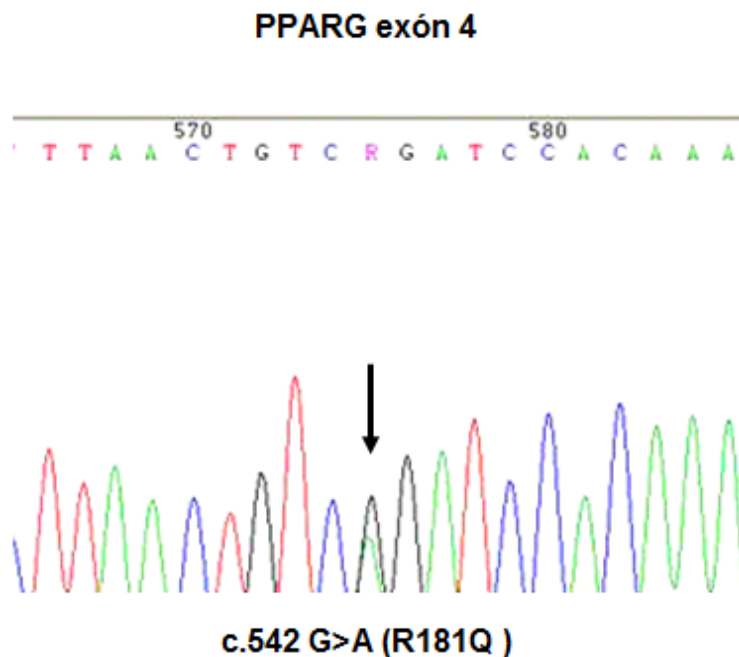


Figura 4.31: Estudio genético en la paciente diagnosticada. Electroferograma de la secuencia de ADN que muestra el cambio heterocigótico de G por A en la posición 542 (exón 4) del gen *PPARG*, suponiendo una sustitución R181Q en la proteína. La mutación se muestra como dos picos superpuestos (indicados con una flecha).

#### *PPARG* R181Q

Humana	157	EGCKGFFRRTIRLKLIDRCDLNCR	IHKKS	SRNKCQYCRFQKCLAVGMSHN	206
Ratón	156	EGCKGFFRRTIRLKLIDRCDLNCR	IHKKS	SRNKCQYCRFQKCLAVGMSHN	205
Rata	157	EGCKGFFRRTIRLKLIDRCDLNCR	IHKKS	SRNKCQYCRFQKCLAVGMSHN	206
Pollo	127	EGCKGFFRRTIRLKLIDRCDLNCR	IHKKS	SRNKCQYCRFQKCLAVGMSHN	176
Rana	131	EGCKGFFRRTIRLKLIE	RCDLNCR	IHKKS	SRNKCQF CRFQKCLAVGMSHN 180

Figura 4.32: Región polipeptídica alrededor de la mutación R181Q detectada en nuestra paciente. Comparación de esta región del receptor nuclear PPAR $\gamma$  entre diferentes especies: humanos (*Homo sapiens*), ratón (*Mus musculus*), rata (*Rattus norvegicus*), pollo (*Gallus gallus*) y rana (*Xenopus laevis*). El residuo aminoacídico R181 se conserva entre las 5 especies estudiadas.

Tabla 4.11: Características de la paciente con FPLD2, portadora del genotipo *PPARG* R181Q.

	Genotipo R181Q	Rango de normalidad
<i>Antropometría y composición corporal</i>		
Sexo (M/F)	F	
Edad (años)	43	
Talla (cm)	1.53	
Peso (kg)	76.7	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	32.77	21 - 26
Cintura (cm)	108	
Caderas (cm)	99	
WHR	1.09	0.68 - 0.83
PC Bicipital (mm)	6.4	
PC Tricipital (mm)	21.1	
PC Subescapular (mm)	24.3	
PC Supraíliaco (mm)	42	
PC Muslo (mm)	14.7	
PC Pantorrilla (mm)	12.4	
% Grasa total*	40.5	28 - 40
% Grasa tronco*	46.3	20 - 45
% Grasa EESS*	35.3	25 - 50
% Grasa EEII*	32	30 - 50
<i>Parámetros bioquímicos y del metabolismo de la glucosa</i>		
Glucosa basal (mg/dL)	106	74.0 - 105.0
Insulina basal (mUI/L)	12.5	1.5 - 18.5
Hemoglobina A1C (%)	5.4	3.9 - 6.1
Leptina (ng/ml)	4.0	10.0 - 60.0
HOMA-IR	3.32	
Colesterol total (mg/dL)	235	120 - 254
Triglicéridos (mg/dL)	249	25 - 150
Colesterol LDL (mg/dL)	153	80 - 140
Colesterol HDL (mg/dL)	33	35 - 84
IL-6 (pg/ml)	2.3	0.0 - 5.0
TNF-alfa (pg/ml)	11.0	0.0 - 8.1
<i>Aspectos clínicos</i>		
Inicio de lipoatrofia	Niñez	
Patología asociada	HTA, hipertrigliceridemia	

IMC, índice de masa corporal; WHR, "Waist-hip ratio" (Índice cintura-cadera); PC, pliegue cutáneo; \*, % de grasa corporal determinado por DEXA; EESS, extremidades superiores; EEII, extremidades inferiores; Hemoglobina A1C, hemoglobina glicosilada; HOMA-IR, "homeostasis model assessment-insulin resistance"; HTA, hipertensión arterial.



#### 4.1.1. 2.B. Mutación S410R

##### **Pedigrí P.1**

En otra de las pacientes estudiadas, procedente de Galicia, con distribución atípica de la grasa: acumulación de grasa en la cara, cuello, tórax y abdomen, con escaso TAsc en extremidades y glúteos (Figura 4.33) y acantosis nigricans, se encontró una mutación heterocigótica no descrita en el gen *PPARG*, que consiste en el cambio de C por A en el nucleótido 1230 que supone la sustitución de serina por arginina (S410R) (Figura 4.34).



Figura 4.33: Vista anterior de la paciente diagnosticada con la mutación *PPARG* S410R, asociada con FPLD2 atípica, mostrando pérdida de grasa subcutánea en caderas y extremidades inferiores. Se puede apreciar además el exceso de grasa en: cuello, cara y tronco.

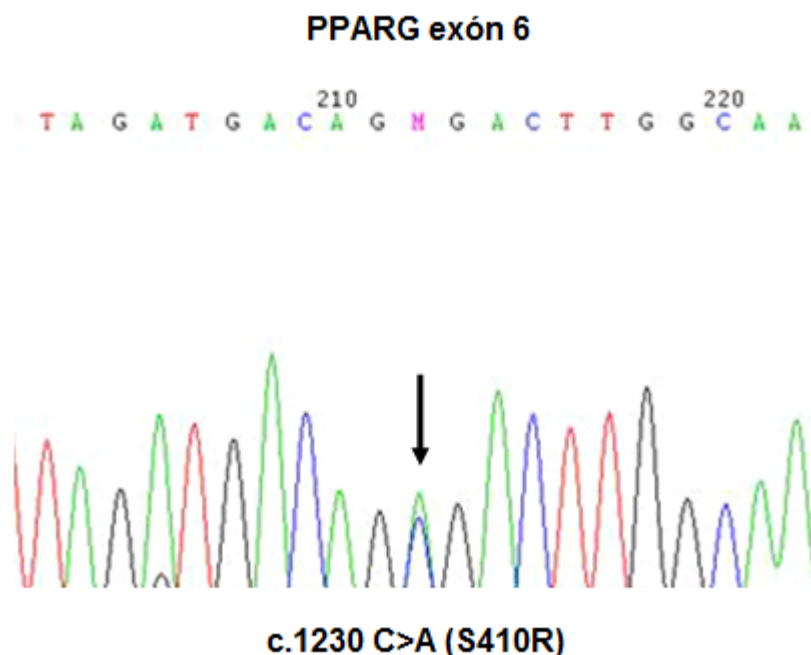


Figura 4.34: Estudio genético de la paciente diagnosticada. Electroferograma de la secuencia de ADN que muestra el cambio heterocigótico de C por A en la posición 1230 (exón 6) del gen *PPARG*, suponiendo una sustitución S410R en la proteína. La mutación se muestra como dos picos superpuestos (indicados con una flecha).

#### *PPARG* S410R

Humana	358	KPFGDFMEPKFEFAVKFNALELDD\$DLAIFI	AVIILSGDRPGLLNVKPIE	407
Ratón	356	KPFGDFMEPKFEFAVKFNALELDD\$DLAIFI	AVIILSGDRPGLLNVKPIE	405
Rata	356	KPFGDFMEPKFEFAVKFNALELDD\$DLAIFI	AVIILSGDRPGLLNVKPIE	405
Pollo	356	KPFCDFMEPKFEFAVKFNALELDD\$DLAIFI	AVIILSGDRPGLLNVKPIE	405
Rana	358	KPFSDFMEPKFEFAIRFNSLELDD\$DLAIFV	AVIILSGDRPGLLNVKPIE	407

Figura 4.35: Región polipeptídica alrededor de la mutación S410R detectada en nuestros pacientes. Comparación de esta región del receptor nuclear PPAR $\gamma$  entre diferentes especies: humanos (*Homo sapiens*), ratón (*Mus musculus*), rata (*Rattus norvegicus*), pollo (*Gallus gallus*) y rana (*Xenopus laevis*). El residuo aminoacídico S410 se conserva entre las 5 especies estudiadas.

Tabla 4.12: Características de la paciente con FPLD2, portadora del genotipo *PPARG* S410R.

	Genotipo S410R	Rango de normalidad
<i>Antropometría y composición corporal</i>		
Sexo (M/F)	F	
Edad (años)	51	
Talla (cm)	1.59	
Peso (kg)	74	
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	29.27	22 - 27
Cintura (cm)	102	
Caderas (cm)	101	
WHR	1.01	0.68 - 0.83
PC Bicipital (mm)	4.1	
PC Tricipital (mm)	5.1	
PC Subescapular (mm)	46	
PC Suprailíaco (mm)	31	
PC Muslo (mm)	5.8	
PC Pantorrilla (mm)	4.3	
% Grasa total*	43.5	28 - 40
% Grasa tronco*	52.6	20 - 45
% Grasa EESS*	43.3	25 - 50
% Grasa EEII*	27.1	30 - 50
<i>Parámetros bioquímicos y del metabolismo de la glucosa</i>		
Glucosa basal (mg/dL)	176	74 - 105
Insulina basal (mUI/L)	10.5	1.5 - 18.5
Hemoglobina A1C (%)	7.7	3.9 - 6.1
Leptina (ng/ml)	1.2	10.0 - 60.0
Colesterol total (mg/dL)	246	
Triglicéridos (mg/dL)	117	
Colesterol LDL (mg/dL)	143	
Colesterol HDL (mg/dL)	57	
HOMA-IR	4.62	
IL-6 (pg/ml)	2.0	
TNF-alfa (pg/ml)	7.7	
<i>Aspectos clínicos</i>		
Inicio de lipoatrofia	Pubertad	
Patología asociada	DM, HTA, Acantosis nigricans	

IMC, índice de masa corporal; WHR, "Waist-hip ratio" (Índice cintura-cadera); PC, pliegue cutáneo; Hemoglobina A1C, hemoglobina glicosilada; HOMA-IR, "homeostasis model assessment-insulin resistance"; DM, diabetes mellitus; HTA, hipertensión arterial.

#### 4.1.1.3. Pacientes con sospecha de FPLD sin diagnóstico molecular

En un grupo de 55 mujeres con sospecha de FPLD no se encontró ninguna mutación en las regiones codificantes de los genes *LMNA* o *PPARG*. Estas pacientes presentaban una evidente distribución anormal de la grasa corporal, caracterizada por exceso de grasa en el tronco, cuello y cara, con escaso TAsc en las extremidades, sobre todo en las inferiores (Figura 4.36). Esta distribución anormal de la grasa corporal estaba asociada a alteraciones metabólicas, como resistencia a la insulina, diabetes mellitus e hiperlipidemia (ver apartado 4.1.3). Características éstas que se corresponden con la lipodistrofia parcial familiar tipo Köbberling (FPLD1).



Figura 4.36: Pacientes con FPLD1. Muestran pérdida de grasa en caderas, glúteos y extremidades (principalmente inferiores). Mientras que presentan un notable incremento de la grasa en la cara, cuello, abdomen y espalda. (Cortesía del Prof. Araújo-Vilar, Facultad de Medicina de Santiago de Compostela)

#### 4.1.2. PREVALENCIA DE POLIMORFISMOS

##### 4.1.2.1. SNPs encontrados en *LMNA*

En los fragmentos secuenciados del gen *LMNA*, se encontraron 5 polimorfismos diferentes que no generan cambio de aminoácido (Tabla 4.13).

Tabla 4.13: Polimorfismos encontradas en *LMNA*

Polimorfismo	Alelos	Exón	Referencia*	Frecuencia control/ FPLD (%)	Hetero/ Homocigótico
S17S	c.51 C>T	1	rs11549668	7/11	5/1
L204L	c.612 G>A	3	rs12117552	8/1	2/0
A287A	c. 861 T>C	5	rs538089	0/14	7/0
D446D	c. 1338 T>C	7	rs505058	10/31	18/1
H566H	c. 1698 C>T	10	rs4641	16/36	20/6

\*, datos disponibles en: [http:// www.dmd.nl/](http://www.dmd.nl/)

El polimorfismo sinónimo S17S (rs11549668) está descrito en la posición 300 del ARNm de *LMNA* (NM\_005572.3), y para la proteína NP\_005563 en la serina de la posición 17.

Las frecuencias de las variantes genómicas y alélicas de este SNP en la población europea de referencia y en nuestra muestra son las siguientes:

SNP S17S	Frecuencia genotípica		Frecuencia alélica	
	C/C	C/T	C	T
Población de referencia *	0.976	0.024	0.988	0.012
Población estudiada (n=110)	0.92	0.08	0.96	0.04

\* Descrita en [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

SNP S17S	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica	
	C/C	C/T	Chi-Sq p	C	T
Control (n=34)	0.94	0.06	ns	0.97	0.03
Sospecha FPLD (n=76)	0.91	0.09		0.95	0.05

El polimorfismo sinónimo L204L (rs12117552) en *LMNA* fue descrito por Taylor y cols. en 2004. Pero no hay datos disponibles sobre las frecuencias de las variantes genotípicas ni alélicas. En nuestra muestra se encontró:

SNP L204L	Frecuencia genotípica		Frecuencia alélica	
	G/G	G/A	G	A
Población estudiada (n=110)	0.965	0.035	0.98	0.018

SNP L204L	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica	
	G/G	G/A	Chi-Sq p	G	A
Control (n=34)	0.89	0.11	0.01	0.944	0.055
Sospecha FPLD (n=76)	0.98	0.02		0.993	0.007

El polimorfismo sinónimo A287A (rs538089) está descrito en la posición 1110 del ARNm de *LMNA* (NM\_005572.3) y para la proteína (NP\_005563.1) en el residuo de alanina de la posición 287.

Las frecuencias de las variantes genómicas y alélicas de este SNP en la población europea de referencia y en nuestra población son las siguientes:

SNP A287A	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica	
	T/T	T/C	C/C	T	C
Población de referencia*	0.629	0.289	0.082	0.774	0.226
Población estudiada (n=110)	0.83	0.15	0.09	0.92	0.08

\* Descrita en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

SNP A287A	Frecuencia genotípica				Frecuencia alélica	
	T/T	T/C	C/C	Chi-Sq p	T	C
Control (n=34)	1.00	0.00	0.00	0.01	1.0	0.0
Sospecha FPLD (n=76)	0.77	0.22	0.14		0.88	0.12

El polimorfismo sinónimo D446D (rs505058) está descrito en la posición 1587 del ARNm de *LMNA* (NM\_005572.3) y para la proteína (NP\_005563.1) en el residuo de aspartato de la posición 446.

Las frecuencias de las variantes genómicas y alélicas de este SNP en la población europea de referencia y en nuestra población son las siguientes:

SNP D446D	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica	
	T/T	T/C	C/C	T	C
Población de referencia*	0,784	0,193	0,023	0,881	0,119
Población estudiada (n=110)	0,745	0,226	0,028	0,87	0,013

\* Población TSI (Toscana) descrita en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

SNP D446D	Frecuencia genotípica				Frecuencia alélica	
	T/T	T/C	C/C	Chi-Sq p	T	C
Control (n=34)	0,906	0,094	0,000	0,03	0,953	0,047
Sospecha FPLD (n=76)	0,685	0,274	0,041		0,820	0,180

El polimorfismo sinónimo H566H (rs4641) está descrito en la posición 1947 del ARNm de *LMNA* (NM\_005572.3) y para la proteína (NP\_005563.1) en el residuo de histidina de la posición 566.

Las frecuencias de las variantes genómicas y alélicas de este SNP en la población europea de referencia y en nuestra población son las siguientes:

H566H	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica	
	C/C	C/T	T/T	C	T
Población de referencia*	0,580	0,364	0,057	0,761	0,239
Población estudiada (n=110)	0,694	0,222	0,083	0,85	0,15

\*Población TSI (Toscana) descrita en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

H566H	Frecuencia genotípica				Frecuencia alélicas	
	C/C	C/T	T/T	Chi-Sq p	C	T
Control (n=34)	0,790	0,09	0,12	ns	0,833	0,167
Sospecha FPLD (n=76)	0,662	0,27	0,068		0,80	0,20

En todos los polimorfismos encontrados en el gen *LMNA*, tanto en la población total como en las subpoblaciones estudiadas, las frecuencias de las variantes alélicas cumplen con el Equilibrio Hardy-Weinberg.

#### 4.1.2.2. SNPs encontrados en *PPARG*

En los fragmentos secuenciados del gen *PPARG*, se encontraron 3 polimorfismos, uno de ellos no sinónimo (Tabla 4.14).

Tabla 4.14: Polimorfismos encontradas en *PPARG*

Polimorfismo	Alelos	Exón	Referencia*	Frecuencia en FPLD (%)	Hetero/ Homocigótico
P12A	c.34 C>G	1	rs1801282	24	10/0
D144D	c.432 T>C	3	ND	4	1/0
L449L	c.1345 C>T	7	ND	29	8/4

\*, registrado en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; ND, no descrito.

El polimorfismo no sinónimo **P12A** (rs1801282) está descrito en la posición 34 del ARNm de *PPARG* (NM\_015869.4) y para la proteína (NP\_056953.2) en el residuo de prolina de la posición 12.

El análisis predictivo de patogenicidad para la sustitución PPAR $\gamma$ 2 P12A, mediante el programa “PolyPhen-2” (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) revela que es probablemente perjudicial con una puntuación 0.984.

Las frecuencias de las variantes genómicas y alélicas de este SNP en la población europea de referencia y en nuestra muestra son las siguientes:

P12A	Frecuencia genotípica			Frecuencia alélica	
	C/C	C/G	G/G	C	G
Población de referencia*	0.864	0.136	-	0.932	0.068
Población estudiada (n= 84)	0.76	0.24	0	0,89	0,11

\*, Estudio de una población europea registrado en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Las frecuencias de las variantes alélicas de este SNP cumplen con el Equilibrio Hardy-Weinberg.

P12A	Frecuencia genotípica				Frecuencia alélica	
	C/C	C/G	G/G	Chi-Sq p	C	G
Control (n=34)	0,88	0,12	0	0,05	0,94	0,06
Sospecha FPLD (n=50)	0,74	0,26	0		0,87	0,13

#### 4.1.3. CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

##### 4.1.3.1. Muestra general

Al comparar las características fenotípicas de la población con sospecha de FPLD con respecto a la población control se observó:

Mayor presión arterial diastólica (PAD), mayor perímetro de cintura y menor perímetro de cadera y de muslo (Tabla 4.15). La medición de los pliegues cutaneos (Figura 4.36), así como la determinación de la composición corporal de la grasa por DEXA (Tabla 4.16 y Figura 4.37) muestran una reducción de la grasa en extremidades inferiores. El porcentaje de diabetes mellitus tipo 2 (DM2), de hiperlipidemia, hipertrigliceridemia e hipertensión arterial (HTA) fue mayor (Tabla 4.17). Estas pacientes presentaron mayores niveles de glucosa e insulina



basal, y una disminución de la sensibilidad a la insulina (Tabla 4.18), un incremento en los niveles de triglicéridos y colesterol VLDL y una disminución del colesterol HDL (Tabla 4.18).

Tabla 4.15: Características antropométricas de la muestra general.

	<b>Controles (n=69)</b>	<b>Sospecha FPLD (n=76)</b>	<b>p</b>
Edad (años)	50 ± 18	49 ± 14	ns
PAS (mmHg)	133 ± 16	138 ± 17	ns
PAD (mmHg)	77 ± 10	83 ± 11	0.0001
Peso (kg)	75 ± 15	79 ± 12	ns
Talla (cm)	157 ± 7	155 ± 6	ns
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	31.2 ± 6	32.9 ± 5	ns
Cintura (cm)	96 ± 14	106 ± 11	0.0001
Cadera (cm)	111 ± 11	104 ± 8	0.0001
Muslo (cm)	60 ± 8	55 ± 6	0.0001
WHR	0.87 ± 0.10	1.02 ± 0.07	0.0001
Cint/muslo	1.79 ± 0.24	1.95 ± 0.19	0.0001

PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; IMC, índice de masa corporal; WHR, "Waist-hip ratio" (Índice cintura-cadera); FPLD, lipodistrofia parcial familiar; ns, no significativo. Los datos representan las medias ± DS.

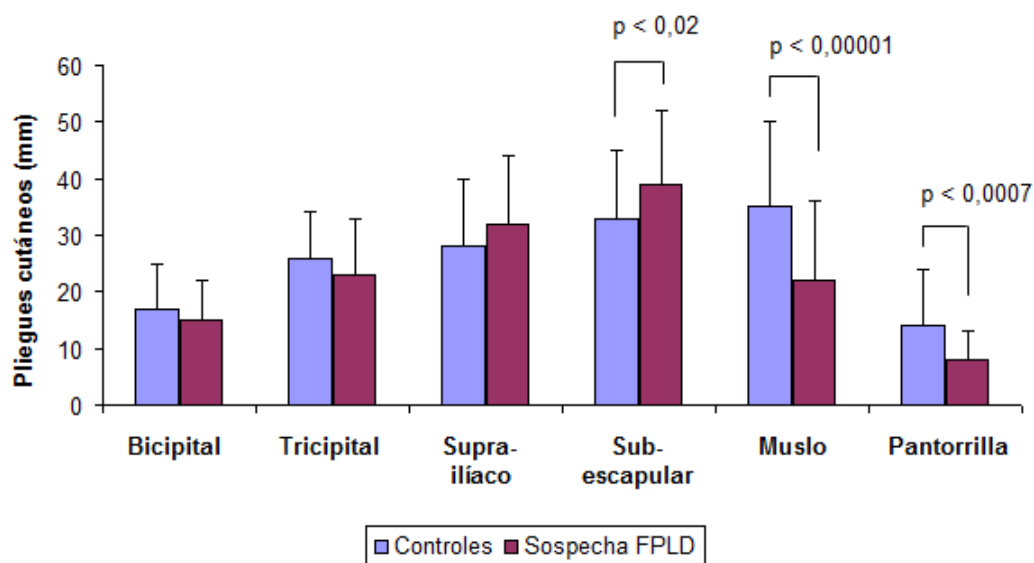


Figura 4.36: Pliegues cutáneos de varias regiones anatómicas de las mujeres estudiadas con sospecha de FPLD y del grupo control.

Tabla 4.16: Composición corporal (grasa) de la muestra general determinada por DEXA.

	Controles (n=21)	Sospecha FPLD (n=43)	p
Grasa Total (kg)	30 ± 13	32 ± 8	ns
MLG total (kg)	40 ± 6	43 ± 5	0.03
G. EESS (kg)	3.4 ± 1.8	3.5 ± 1.0	ns
MLG EESS (kg)	4.1 ± 0.7	4.9 ± 0.8	0.004
G.EEII (kg)	9.1 ± 2.5	7.1 ± 2.7	0.009
MLG EEII (kg)	13 ± 2	14 ± 2	ns
G.Tronco (kg)	16 ± 10	20 ± 6	ns
MLG Tronco (kg)	20 ± 4	22 ± 3	ns
G. EE/Tronco	1.0 ± 0.5	0.5 ± 0.1	0.0007

MGL, masa libre de grasa; MG, masa grasa; EESS, extremidades superiores; EEII, extremidades inferiores; ns, no significativo. Los datos representan las medias ± DS.

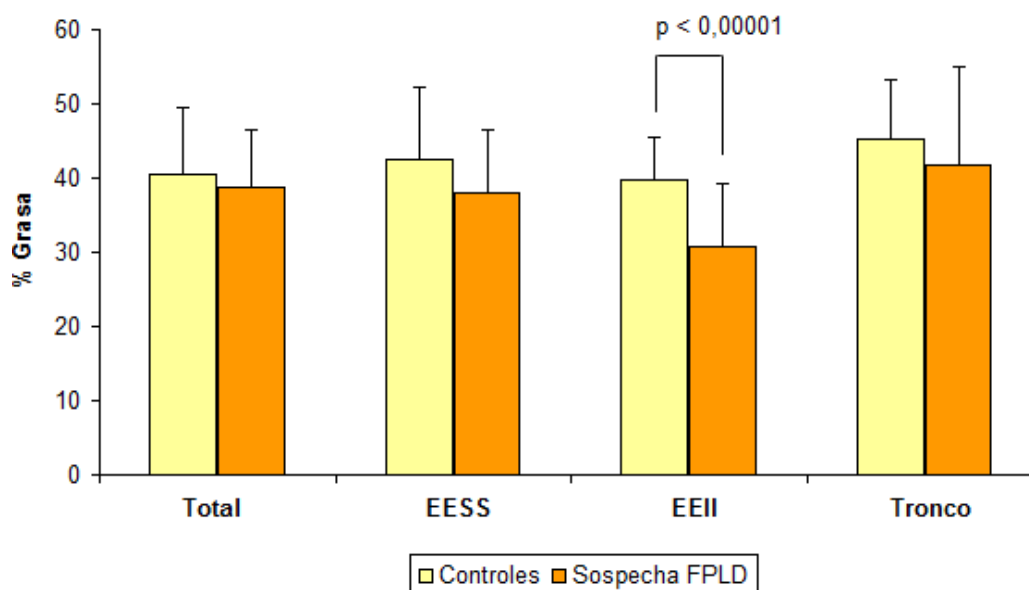


Figura 4.37: Distribución de la grasa corporal, determinada por DEXA, en las mujeres estudiadas con sospecha de FPLD y el grupo control. EESS, extremidades superiores; EEII, extremidades inferiores.

Tabla 4.17: Datos clínicos de la muestra general.

	Controles (n=69)	Sospecha FPLD (n=76)	p
Menopausia %	61.7	51.7	ns
Alteración met HC %	56	75	ns
DM2 %	35.3	63.3	0.01
HLP %	49	83	0.0001
HLP IIa %	28	32	ns
HLP IIb %	13	28	0.03
HLP IV %	9	22	0.01
HTA %	37	57	0.02

Alteración met HC, alteración del metabolismo hidrocarbonado (glucemia basal alterada, intolerancia a la glucosa, diabetes mellitus); DM2, diabetes mellitus tipo 2; HLP, hiperlipoproteínemia; HTA, hipertensión arterial; ns, no significativo.

Tabla 4.18: Datos bioquímicos de la muestra general.

	Controles (n=69)	Sospecha FPLD (n=76)	p
Glucosa (mg/dL)	115 ± 55	157 ± 85	0.002
Hb A1c (%)	6.7 ± 1.5	7.2 ± 2.1	ns
Insulina (mUI/L)	7.2 ± 5.4	16 ± 18	0.01
HOMA-IR	2.0 ± 2.4	5.6 ± 5.6	0.00006
Leptina (ng/ml)	27 ± 21	23 ± 18	ns
Col. Total (mg/dL)	190 ± 35	200 ± 60	ns
TG (mg/dL)	108 ± 67	181 ± 48	0.0009
Col. LDL (mg/dL)	114 ± 28	116 ± 43	ns
Col. HDL (mg/dL)	51 ± 15	43 ± 15	0.002
Col. VLDL (mg/dL)	21 ± 13	32 ± 31	0,03
Cortisol (ug/dL)	17 ± 6	17 ± 7	ns
TSH (mUI/L)	3.0 ± 2.1	3.3 ± 6.7	ns
T3 libre (pg/mL)	3.1 ± 0.5	3.3 ± 0.7	ns
T4 libre (ng/dL)	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.4	ns
LH (UI/L)	15 ± 16	15 ± 13	ns
FSH (UI/L)	27 ± 23	24 ± 30	ns
E2 (pg/mL)	53 ± 75	40 ± 45	ns
Testosterona (ng/mL)	0.38 ± 0.27	0.40 ± 0.24	ns
Creatinina (mg/dL)	1.0 ± 0.7	0.85 ± 0.24	ns
CK (UI/L)	100 ± 52	102 ± 68	ns
AST (UI/L)	21 ± 8	21 ± 21	ns
ALT (UI/L)	25 ± 14	29 ± 34	ns
GGT (UI/L)	23 ± 24	30 ± 34	ns
F.Alcalina (UI/L)	162 ± 64	145 ± 44	ns
A.Úrico (mg/dL)	5.3 ± 1.7	5.2 ± 1.5	ns
TNFAlfa (pg/ml)	13.2 ± 6.1	13.8 ± 14.5	ns
IL6 (pg/ml)	5.8 ± 7.9	4.0 ± 3.5	ns
PCR (mg/dL)	0.6 ± 0.9	1.0 ± 1.7	ns

Hb A1C, hemoglobina glicosilada; HOMA-IR, "homeostasis model assessment-insulin resistance"; Col., colesterol; TG, triglicéridos; TSH, hormona estimulante del tiroides; T3, triyodotironina; T4, tiroxina; LH, hormona luteinizante; E2, estradiol; CK, creatinquinasa; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; FSH, hormona foliculo-estimulante; GGT, gamma glutamil transpeptidasa; IL6, interleuquina 6; PCR, proteína C reactiva; ns, no significativo. Los datos representan las medias ± DS.

## 4.1.3.2. Pacientes diabéticas

Al comparar las características fenotípicas de sólo el grupo de mujeres diabéticas con sospecha de FPLD con respecto a la población control diabética se observó:

Mayor PAD y menor perímetro de cadera (Tabla 4.19). La medición de los pliegues cutáneos (Figura 4.38), así como la determinación de la composición corporal por DEXA (Tabla 4.20 y Figura 4.39) muestran un incremento de la grasa troncular y reducción de la grasa en extremidades inferiores. Fue mayor el porcentaje de pacientes con hiperlipidemia (Tabla 4.21). Las pacientes con sospecha de FPLD presentaron mayores niveles de insulina basal y una disminución de la sensibilidad a la insulina (Tabla 4.22). Se observó un incremento en los niveles de triglicéridos, una disminución de la leptina plasmática y de la interleuquina 6 (Tabla 4.22).

Tabla 4.19: Características antropométricas de las pacientes diabéticas.

	<b>Controles (n=24)</b>	<b>Sospecha FPLD (n=48)</b>	<b>p</b>
Edad (años)	63 ± 14	53 ± 11	0.006
PAS (mmHg)	134 ± 17	140 ± 17	ns
PAD (mmHg)	75 ± 9	82 ± 11	0.005
Peso (kg)	77 ± 14	80 ± 10	ns
Talla (cm)	154 ± 5	154 ± 6	ns
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	32.5 ± 6	33.7 ± 4	ns
Cintura (cm)	102 ± 14	107 ± 8	ns
Cadera (cm)	111 ± 10	105 ± 7	0.05
Muslo (cm)	58 ± 8	54 ± 6	ns
WHR	0.94 ± 0.1	1.02 ± 0.06	0.01
Cint/muslo	1.84 ± 0.37	1.99 ± 0.18	ns

PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; IMC, índice de masa corporal; WHR, "Waist-hip ratio" (índice cintura-cadera); FPLD, lipodistrofia parcial familiar; ns, no significativo. Los datos representan las medias ± DS.

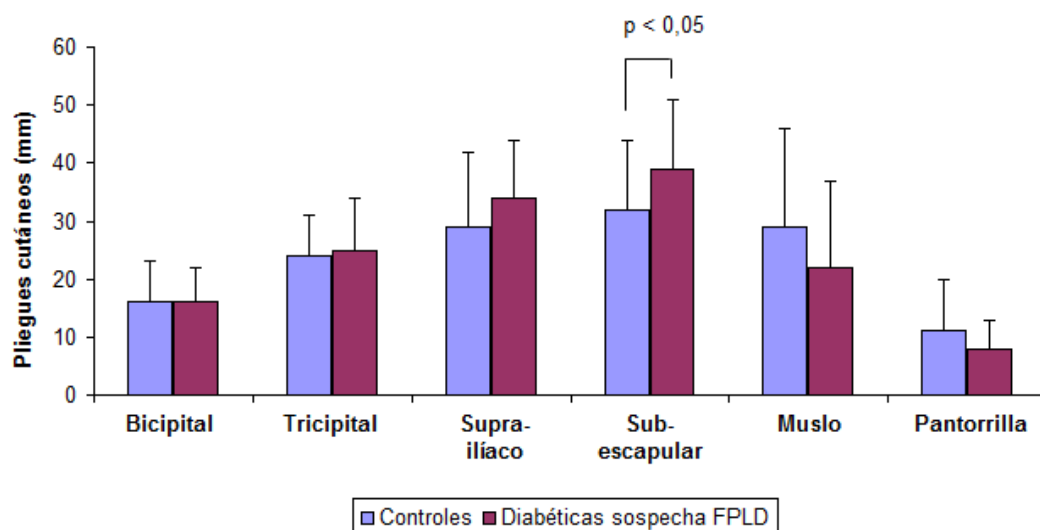


Figura 4.38: Pliegues cutáneos de varias regiones anatómicas de las mujeres diabéticas con sospecha de FPLD y del grupo control.

Tabla 4.20: Composición corporal de las pacientes diabéticas determinada por DEXA.

	Controles (n=7)	Sospecha FPLD (n=26)	p
Grasa Total (kg)	38 ± 14	32 ± 7	ns
MLG total (kg)	43 ± 4	44 ± 6	ns
G. EESS (kg)	4.2 ± 1.7	3.7 ± 0.9	ns
MLG EESS (kg)	4.4 ± 0.6	4.9 ± 0.9	ns
G.EEII (kg)	9.1 ± 2.9	7.2 ± 2.8	ns
MLG EEII (kg)	13 ± 2	14 ± 2	ns
G.Tronco (kg)	24 ± 11	21 ± 4	ns
MLG Tronco (kg)	23 ± 3	22 ± 3	ns
G. EE/Tronco	0.76 ± 0.6	0.53 ± 0.1	ns

MGL, masa libre de grasa; MG, masa grasa; EESS, extremidades superiores; EEII, extremidades inferiores; ns, no significativo.

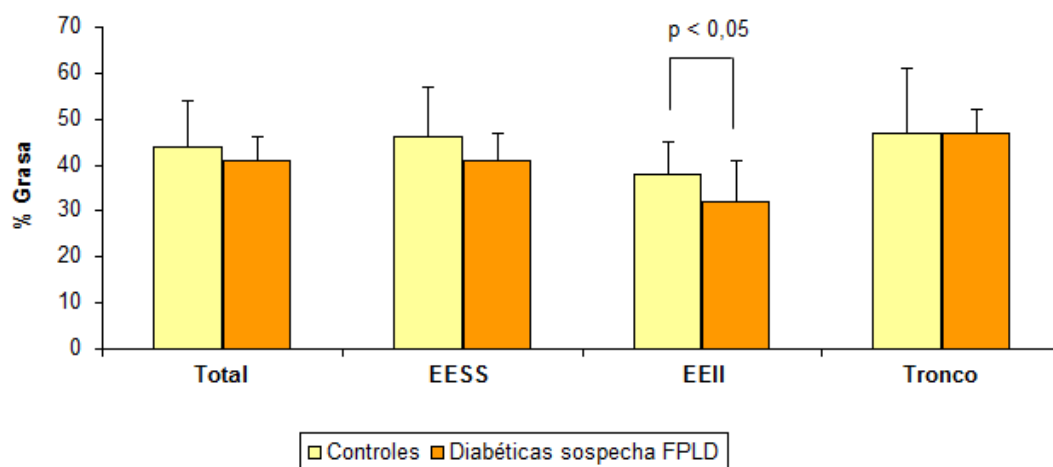


Figura 4.39: Distribución de la grasa corporal, determinada por DEXA, en las mujeres diabéticas con sospecha de FPLD y el grupo control. EESS, extremidades superiores; EEII, extremidades inferiores.

Tabla 4.21: Datos clínicos de las pacientes diabéticas.

	Controles (n=24 )	Sospecha FPLD (n=48)	p
Menopausia %	67	61	ns
HLP %	71	92	0.02
HLP IIa %	50	34	ns
HLP IIb %	25	34	ns
HLP IV %	8	24	0.05
HTA %	58	68	ns

HLP, hiperlipoproteinemia; HTA, hipertensión arterial.

Tabla 4.22: Datos bioquímicos de las pacientes diabéticas.

	<b>Controles (n=24)</b>	<b>Sospecha FPLD (n=48)</b>	<b>p</b>
Glucosa (mg/dL)	166 ± 61	187 ± 87	ns
Hb A1c (%)	7.4 ± 1.3	8.1 ± 1.9	ns
Insulina (mUI/L)	9.0 ± 7.7	16 ± 13	0.02
HOMA-IR	3.7 ± 3.6	6.6 ± 5.0	0.02
Leptina (ng/ml)	36 ± 26	24 ± 17	0.05
Col. Total (mg/dL)	182 ± 40	201 ± 72	ns
TG (mg/dL)	125 ± 69	203 ± 176	0.01
Col. LDL (mg/dL)	111 ± 29	111 ± 45	ns
Col. HDL (mg/dL)	45 ± 14	43 ± 16	ns
Col. VLDL (mg/dL)	22 ± 13	35 ± 36	ns
Cortisol (ug/dL)	15 ± 6	18 ± 6	ns
TSH (mUI/L)	2.6 ± 2.3	3.5 ± 8.7	ns
T3 libre (pg/mL)	2.9 ± 0.5	3.3 ± 0.8	ns
T4 libre (ng/dL)	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.3	ns
LH (UI/L)	22 ± 15	17 ± 14	ns
FSH (UI/L)	42 ± 15	28 ± 34	ns
E2 (pg/mL)	21 ± 39	35 ± 48	ns
Testosterona (ng/mL)	0.35 ± 0.27	0.39 ± 0.26	ns
Creatinina (mg/dL)	1.2 ± 0.8	0.87 ± 0.28	ns
CK (UI/L)	90 ± 50	103 ± 65	ns
AST (UI/L)	21 ± 8	22 ± 24	ns
ALT (UI/L)	25 ± 12	33 ± 40	ns
GGT (UI/L)	28 ± 29	34 ± 39	ns
F Alcalina (UI/L)	178 ± 78	156 ± 48	ns
A Úrico (mg/dL)	5.9 ± 1.7	5.1 ± 1.7	ns
TNFalfa (pg/ml)	16 ± 7	15 ± 18	ns
IL6 (pg/ml)	8.1 ± 10.2	3.2 ± 2.8	0.048
PCR (mg/dL)	0.8 ± 1.4	0.9 ± 1.5	ns

Hb A1C, hemoglobina glicosilada; HOMA-IR, "homeostasis model assessment-insulin resistance"; Col., colesterol; TG, triglicéridos; TSH, hormona estimulante del tiroides; T3, triyodotironina; T4, tiroxina; LH, hormona luteinizante; E2, estradiol; CK, creatinquinasa; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; FSH, hormona foliculo-estimulante; GGT, gamma glutamil transpeptidasa; PCR, proteína C reactiva; IL6, interleuquina 6; ns, no significativo. Los datos representan las medias ± DS.



#### 4.1.3.3. Pacientes menopáusicas

Al comparar las características fenotípicas de sólo el grupo de mujeres menopáusicas con sospecha de FPLD con respecto a la población control menopausica se observó:

Menor perímetro de cadera (Tabla 4.23). La medición de los pliegues cutaneos (Figura 4.40) muestra una disminución de la grasa en extremidades inferiores. Es mayor el porcentaje de DM2 e hiperlipidemia (Tabla 4.25). Presentan mayores niveles de glucosa, hemoglobina glicosilada, insulina basal y triglicéridos, así como una menor sensibilidad a la insulina (Tabla 4.26). Se observa además, una disminución de interleuquina 6 (Tabla 4.26).

Tabla 4.23: Características antropométricas de las pacientes menopáusicas.

	<b>Controles (n=43)</b>	<b>Sospecha FPLD (n=39)</b>	<b>p</b>
Edad (años)	58 ± 14	60 ± 8	ns
PAS (mmHg)	136 ± 17	140 ± 17	ns
PAD (mmHg)	77 ± 10	82 ± 12	ns
Peso (kg)	82 ± 14	80 ± 10	ns
Talla (cm)	155 ± 6	154 ± 7	ns
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	33.92 ± 5	33.43 ± 4	ns
Cintura (cm)	102 ± 11	107 ± 8	ns
Cadera (cm)	113 ± 9	105 ± 8	0.05
Muslo (cm)	60 ± 7	54 ± 6	ns
WHR	0.91 ± 0,1	1.02 ± 0.06	0.0000002
Cint/muslo	1.72 ± 0.30	2.00 ± 0.19	0.00007

PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; IMC, índice de masa corporal; WHR, "Waist-hip ratio" (Índice cintura-cadera); FPLD, lipodistrofia parcial familiar; ns, no significativo. Los datos representan las medias ± DS.

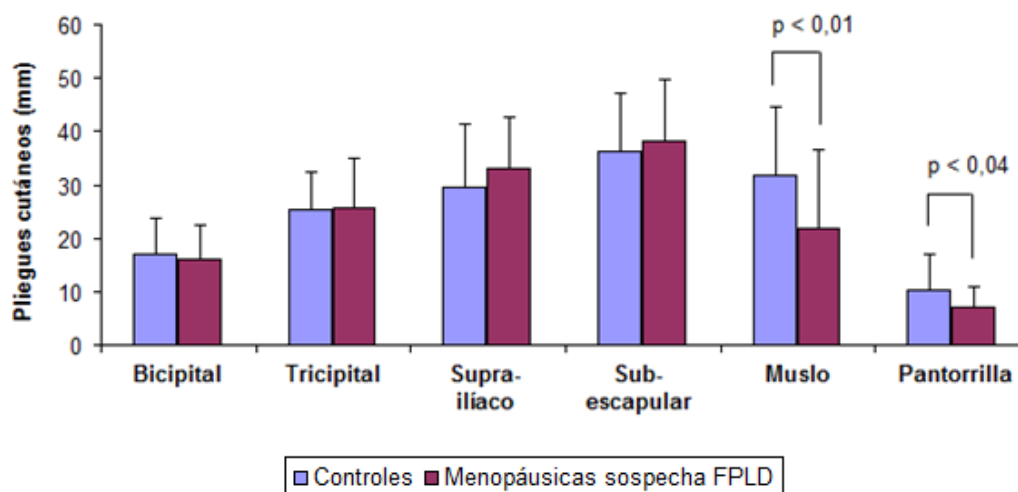


Figura 4.40: Pliegues cutáneos de varias regiones anatómicas de las mujeres menopáusicas con sospecha de FPLD y del grupo control.

Tabla 4.24: Composición corporal (grasa) de las pacientes menopáusicas determinada por DEXA.

	Controles (n=13)	Sospecha FPLD (n=22)	p
Grasa Total (kg)	38 ± 14	32 ± 7	ns
MLG total (kg)	43 ± 4	44 ± 6	ns
G. EESS (kg)	4.2 ± 1.7	3.8 ± 0.9	ns
MLG EESS (kg)	4.4 ± 0.6	4.9 ± 0.7	ns
G.EEII (kg)	9.1 ± 2,9	7.2 ± 2.8	ns
MLG EEII (kg)	13 ± 2	14 ± 2	ns
G.Tronco (kg)	24 ± 11	21 ± 4	ns
MLG Tronco (kg)	23 ± 3	22 ± 3	ns
G. EE/Tronco	0.76 ± 0.6	0.54 ± 0.1	ns

MGL, masa libre de grasa; MG, masa grasa; EESS, extremidades superiores; EEII, extremidades inferiores; ns, no significativo. Los datos representan las medias ± DS.

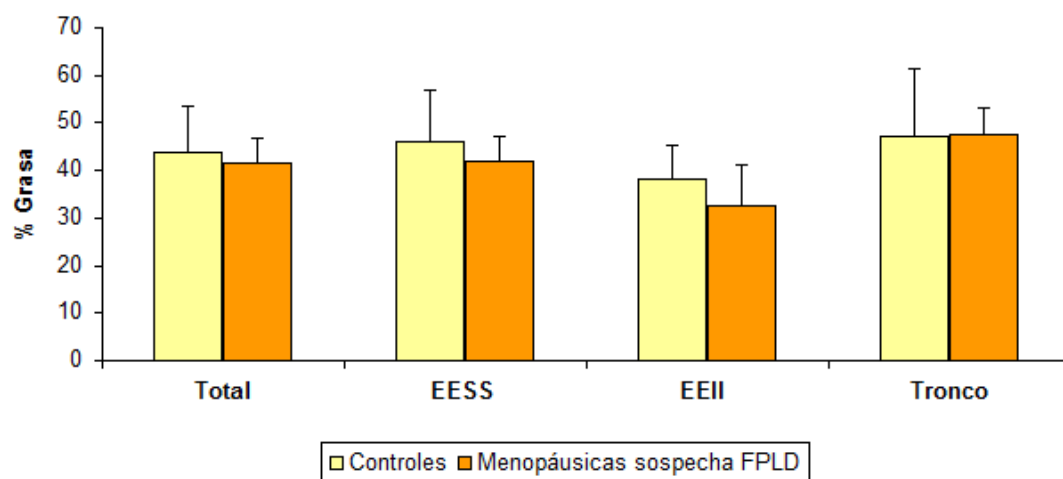


Figura 4.41: Distribución de la grasa corporal, determinada por DEXA, en las mujeres menopáusicas con sospecha de FPLD y el grupo control. EESS, extremidades superiores; EEII, extremidades inferiores.

Tabla 4.25: Datos clínicos de las pacientes menopáusicas.

	Controles (n=43)	Sospecha FPLD (n=39)	p
DM2 %	39	74	0,03
HLP %	61	94	0.01
HLP IIa %	39	52	ns
HLP IIb %	20	35	ns
HLP IV %	7	6	ns
HTA %	51	61	ns

DM2, diabetes mellitus tipo 2; HLP, hiperlipoproteinemia; HTA, hipertensión arterial; ns, no significativo. Los datos representan las medias  $\pm$  DS.

Tabla 4.26: Datos bioquímicos de las pacientes menopáusicas.

	<b>Controles (n=43)</b>	<b>Sospecha FPLD (n=39)</b>	<b>p</b>
Glucosa (mg/dL)	120 ± 60	182 ± 96	0.003
Hb A1c (%)	7.0 ± 1.5	8.0 ± 2.1	0.05
Insulina (mUI/L)	7.0 ± 5.0	12 ± 8.9	0.008
HOMA-IR	1.9 ± 2.3	5.4 ± 4.4	0.02
Leptina (ng/ml)	31 ± 23	23 ± 17	ns
Col. Total (mg/dL)	195 ± 39	204 ± 78	ns
TG (mg/dL)	112 ± 70	180 ± 176	0.05
Col. LDL (mg/dL)	119 ± 32	118 ± 50	ns
Col. HDL (mg/dL)	51 ± 15	46 ± 18	ns
Col. VLDL (mg/dL)	21 ± 14	32 ± 38	ns
Cortisol (ug/dL)	16 ± 6	18 ± 6	ns
TSH (mUI/L)	2.8 ± 2.1	4.1 ± 9.2	ns
T3 libre (pg/mL)	3.0 ± 0.5	3.2 ± 0.9	ns
T4 libre (ng/dL)	1.1 ± 0.2	1.3 ± 0.5	ns
LH (UI/L)	19 ± 15	23 ± 13	ns
FSH (UI/L)	33.1 ± 20	43 ± 34	ns
E2 (pg/mL)	34 ± 47	15 ± 16	ns
Testosterona (ng/mL)	0.35 ± 0.27	0.39 ± 0.30	ns
Creatinina (mg/dL)	1.15 ± 0.8	0.90 ± 0.28	ns
CK (UI/L)	90 ± 50	113 ± 69	ns
AST (UI/L)	20 ± 8	21 ± 26	ns
ALT (UI/L)	24 ± 12	30 ± 42	ns
GGT (UI/L)	29 ± 28	28 ± 32	ns
F Alcalina (UI/L)	176 ± 76	155 ± 46	ns
A Úrico (mg/dL)	6.0 ± 1.7	5.2 ± 1.6	ns
TNFalfa (pg/ml)	13 ± 5	11 ± 3	ns
IL6 (pg/ml)	6.8 ± 9.0	3.2 ± 3.1	0.034
PCR (mg/dL)	0.7 ± 1.1	0.9 ± 1.6	ns

Hb A1C, hemoglobina glicosilada; HOMA-IR, "homeostasis model assessment-insulin resistance"; Col., colesterol; TG, triglicéridos; TSH, hormona estimulante del tiroides; T3, triyodotironina; T4, tiroxina; LH, hormona luteinizante; E2, estradiol; CK, creatinquinasa; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; FSH, hormona folículo-estimulante; GGT, gamma glutamil transpeptidasa; IL6, interleuquina 6; PCR, proteína C reactiva; ns, no significativo. Los datos representan las medias ± DS.

#### 4.1.3.4. Pacientes no-menopáusicas

Al comparar las características fenotípicas de sólo el grupo de mujeres no-menopáusicas con sospecha de FPLD con respecto a la población control no menopáusica se observó:

Más elevada la PAD, mayor perímetro de cintura e índice de masa corporal (IMC) (Tabla 4.27). La medición de los pliegues cutáneos (Figura 4.42), así como la determinación de la composición corporal de la grasa por DEXA (Tabla 4.28 y Figura 4.43) muestran un incremento de la grasa troncular y una reducción de la grasa en extremidades inferiores. Fue mayor el porcentaje de hiperlipidemia, de hipertrigliceridemia y de HTA (Tabla 4.29). Estas mujeres presentaron mayores niveles de insulina basal y triglicéridos, así como una disminución de la sensibilidad a la insulina (Tabla 4.30). Se observó un incremento en los niveles de colesterol VLDL, y una disminución de colesterol HDL. Además se encontraron incrementados los niveles de gamma glutamil transpeptidasa (GGT) y ácido úrico (Tabla 4.30).

Tabla 4.27: Características antropométricas de las pacientes no-menopáusicas.

	<b>Controles (n=26)</b>	<b>Sospecha FPLD (n=37)</b>	<b>p</b>
Edad (años)	37 ± 16	38 ± 10	ns
PAS (mmHg)	128 ± 13	135 ± 18	ns
PAD (mmHg)	76 ± 9	84 ± 10	0.002
Peso (kg)	70 ± 13	78 ± 13	0.03
Talla (cm)	161 ± 7	156 ± 5	0.003
IMC kg/m <sup>2</sup> )	27.3 ± 5	32.4 ± 6	0.001
Cintura (cm)	88 ± 14	104 ± 14	0.0001
Cadera (cm)	107 ± 12	103 ± 9	ns
Muslo (cm)	60 ± 9	56 ± 5	0.04
WHR	0.83 ± 0.1	1.01 ± 0.07	0.00000002
Cint/muslo	1.48 ± 0.25	1.89 ± 0.18	0.00000009

PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; IMC, índice de masa corporal; WHR, "Waist-Hip ratio" (índice cintura-cadera); FPLD, lipodistrofia parcial familiar; ns, no significativo. Los datos representan las medias ± DS.

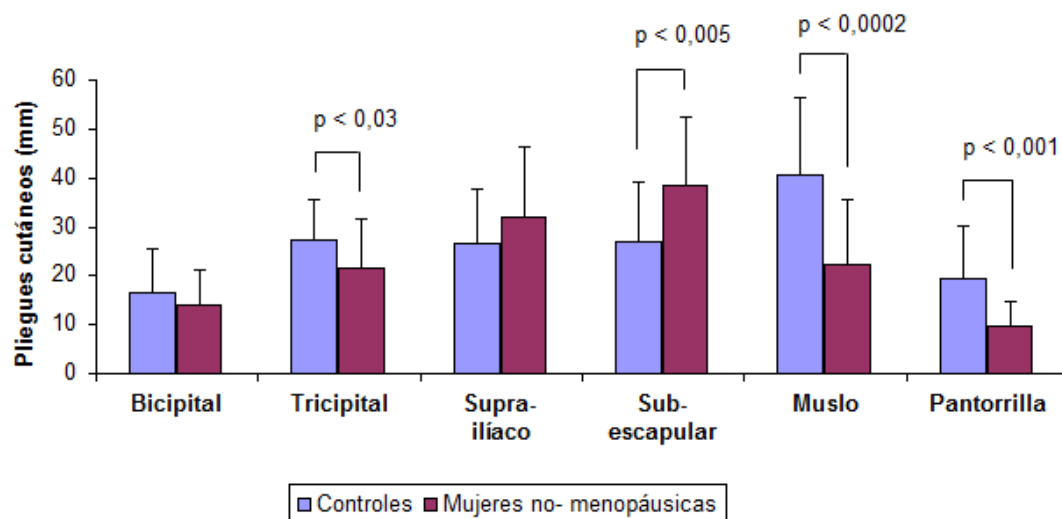


Figura 4.42: Pliegues cutáneos de varias regiones anatómicas de las mujeres no-menopáusicas con sospecha de FPLD y del grupo control.

Tabla 4.28: Composición corporal de las pacientes no- menopáusicas determinada por DEXA.

	Controles (n=8)	Sospecha FPLD (n=21)	p
Grasa Total (kg)	24 ± 10	31 ± 9	ns
MLG total (kg)	38 ± 5	43 ± 5	0.02
G. EESS (kg)	3.0 ± 1.7	3.0 ± 1.1	ns
MLG EESS (kg)	3.9 ± 0.6	4.6 ± 1.0	0.02
G.EEII (kg)	9.1 ± 2.3	7.0 ± 2.6	0.04
MLG EEII (kg)	13 ± 2	13 ± 3	ns
G.Tronco (kg)	12 ± 7	20 ± 7	0.005
MLG Tronco (kg)	18 ± 3	22 ± 2	ns
G. EE/Tronco	1.2 ± 0.4	0.5 ± 0.1	0.0003

MGL, masa libre de grasa; MG, masa grasa; EESS, extremidades superiores; EEII, extremidades inferiores; ns, no significativo. Los datos representan las medias ± DS.

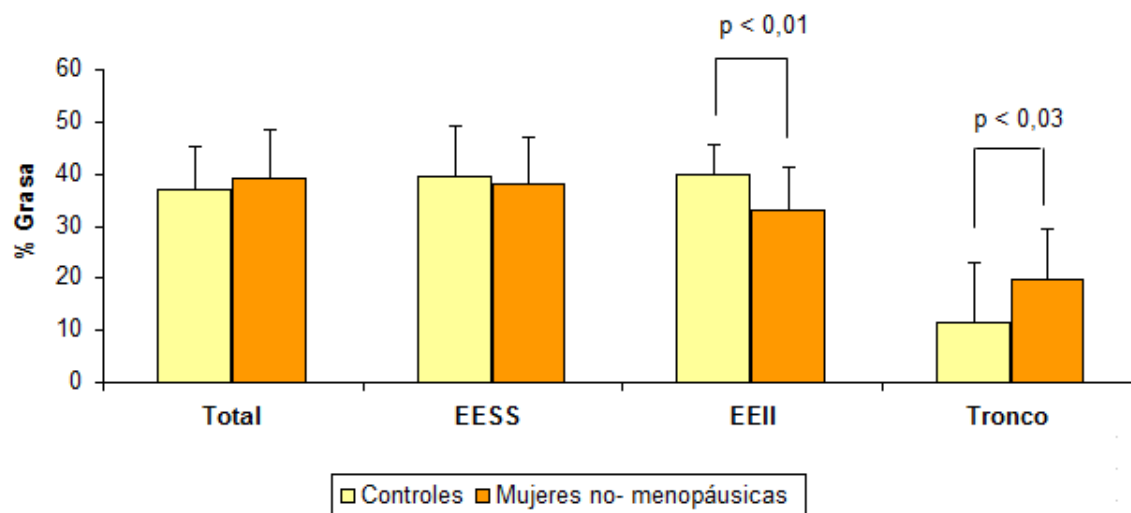


Figura 4.43: Distribución de la grasa corporal, determinada por DEXA, en las mujeres no-menopáusicas con sospecha de FPLD y el grupo control. EESS, extremidades superiores; EEII, extremidades inferiores.

Tabla 4.29: Datos clínicos de las pacientes no-menopáusicas.

	Controles (n=26)	Sospecha FPLD (n=37)	p
DM2 %	30	30	ns
HLP %	26	70	0.02
HLP IIa %	11	10	ns
HLP IIb %	4	20	0.04
HLP IV %	11	37	0.02
HTA %	15	50	0.02

DM2, diabetes mellitus tipo 2; HLP, hiperlipoproteinemia; HTA, hipertensión arterial; ns, no significativo.

Tabla 4.30: Datos bioquímicos de las pacientes no-menopáusicas.

	<b>Controles (n=26)</b>	<b>Sospecha FPLD (n=37)</b>	<b>p</b>
Glucosa (mg/dL)	108 ± 45	129 ± 60	ns
Hb A1c (%)	6.2 ± 1.4	6.3 ± 1.7	ns
Insulina (mUI/L)	7.6 ± 6.4	19.4 ± 23.4	0.02
HOMA-IR	2.4 ± 2.6	5.9 ± 6.8	0.02
Leptina (ng/ml)	20 ± 16	22 ± 19	ns
Col. Total (mg/dL)	181 ± 25	196 ± 32	ns
TG (mg/dL)	103 ± 62	182 ± 114	ns
Col. LDL (mg/dL)	107 ± 19	114 ± 35	ns
Col. HDL (mg/dL)	52 ± 14	40 ± 10	0.0009
Col. VLDL (mg/dL)	20 ± 12	31 ± 18	0.04
Cortisol (ug/dL)	18 ± 7	17 ± 6	ns
TSH (mUI/L)	3.2 ± 2.2	2.4 ± 1.9	ns
T3 libre (pg/mL)	3.3 ± 0.6	3.3 ± 0.4	ns
T4 libre (ng/dL)	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.2	ns
LH (UI/L)	15 ± 17	6 ± 5	ns
FSH (UI/L)	17 ± 24	6 ± 6	ns
E2 (pg/mL)	89 ± 104	65 ± 50	ns
Testosterona (ng/mL)	0.47 ± 0.29	0.42 ± 0.18	ns
Creatinina (mg/dL)	0.85 ± 0.14	0.76 ± 0.13	ns
CK (UI/L)	124 ± 60	89 ± 67	ns
AST (UI/L)	21 ± 8	20 ± 11	ns
ALT (UI/L)	27 ± 18	29 ± 20	ns
GGT (UI/L)	14 ± 10	33 ± 36	0.02
F Alcalina (UI/L)	136 ± 18	134 ± 39	ns
A Úrico (mg/dL)	4.0 ± 0.8	5.1 ± 1.4	0.01
TNFalfa (pg/ml)	14 ± 8	17 ± 20	ns
IL6 (pg/ml)	3.8 ± 4.5	4.7 ± 3.8	ns
PCR (mg/dL)	0.5 ± 1.2	1.2 ± 1.7	ns

Hb A1C, hemoglobina glicosilada; HOMA-IR, "homeostasis model assessment-insulin resistance"; Col., colesterol; TG, triglicéridos; TSH, hormona estimulante del tiroides; T3, triyodotironina; T4, tiroxina; LH, hormona luteinizante; E2, estradiol; CK, creatinquinasa; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; FSH, hormona folículo-estimulante; GGT, gamma glutamil transpeptidasa; PCR, proteína C reactiva; IL6, interleuquina 6; ns, no significativo. Los datos representan las medias ± DS.



#### 4.1.3.5. Pacientes FPLD vs. pacientes con sospecha de FPLD sin diagnóstico molecular

Se comparó el grupo de mujeres con sospecha de FPLD en las que no se encontraron mutaciones en *LMNA* o en *PPARG*, respecto a las pacientes con diagnóstico molecular de FPLD (tipo 2 y 3). En este último grupo se incluyeron los datos de 5 mujeres lipodistróficas (*LMNA* R482W) pertenecientes al pedigrí L.1, descrito previamente por nuestro grupo de investigación [341].

El grupo con sospecha de FPLD sin diagnóstico molecular presentó: mayor IMC, mayor perímetro de cintura y muslo (Tabla 4.31). La medición de los pliegues cutáneos (Figura 4.44), así como la determinación de la composición corporal por DEXA (Tabla 4.32 y Figura 4.45) mostraron que las pacientes sin diagnóstico molecular presentaron una mayor cantidad de grasa, tanto troncular como en las extremidades, presentaron mayores niveles de leptina plasmática (Tabla 4.34), cortisol y de la hormona folículo-estimulante (FSH) (Tabla 4.34). En este grupo se observó un mayor porcentaje de pacientes diabéticas.

Tabla 4.31: Características antropométricas de las pacientes FPLD vs. pacientes con sospecha de FPLD.

	<b>FPLD (n=26)</b>	<b>Sospecha FPLD (n=55)</b>	<b>p</b>
Edad (años)	42 ± 16	48 ± 15	0.01
Peso (kg)	67 ± 12	78 ± 17	0.00001
Talla (cm)	161 ± 6	154 ± 19	0.00001
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25.9 ± 4	32.1 ± 7	0.00001
WHR	0.94 ± 0,08	0.99 ± 0,14	0.00001
Cint/muslo	1.81 ± 0.23	1.90 ± 0.30	ns
PAS (mmHg)	129 ± 15	135 ± 22	ns
PAD (mmHg)	81 ± 12	81 ± 14	ns

PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; IMC, índice de masa corporal; WHR, "Waist-hip ratio" (Índice cintura-cadera); FPLD, lipodistrofia parcial familiar; ns, no significativo. Los datos representan las medias ± DS.

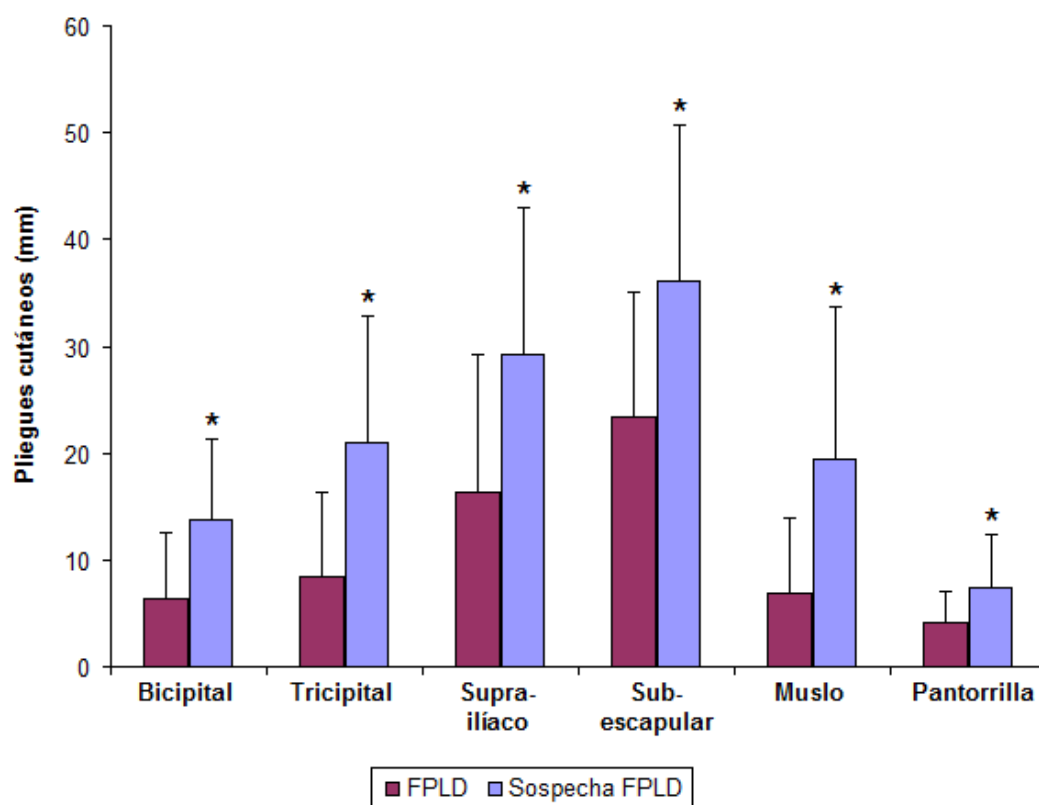


Figura 4.44: Pliegues cutáneos de varias regiones anatómicas de las mujeres FPLD y del grupo con sospecha de FPLD sin hallazgo de mutación en *LMNA* o *PPARG*. \*,  $p < 0,00001$ .

Tabla 4.32: Composición corporal de las pacientes FPLD vs. pacientes con sospecha de FPLD, determinada por DEXA.

	FPLD (n=14)	Sospecha FPLD (n= 31)	p
Grasa Total (kg)	24 ± 9	33 ± 7	0.007
MLG total (kg)	48 ± 5	43 ± 5	0.02
G. EESS (kg)	2.5 ± 1.1	3.7 ± 0.9	0.007
MLG EESS (kg)	5.7 ± 1.1	4.8 ± 0.8	0.04
G.EEII (kg)	5.1 ± 2.6	7.6 ± 2.5	0.02
MLG EEII (kg)	15 ± 2	13 ± 2	0.03
G.Tronco (kg)	16 ± 6	21 ± 5	0.04
MLG Tronco (kg)	23 ± 3	22 ± 3	ns
G. EE/Tronco	0.46 ± 0.11	0.50 ± 0.14	ns

MGL, masa libre de grasa; MG, masa grasa; EESS, extremidades superiores; EEII, extremidades inferiores; ns, no significativo. Los datos representan las medias ± DS.

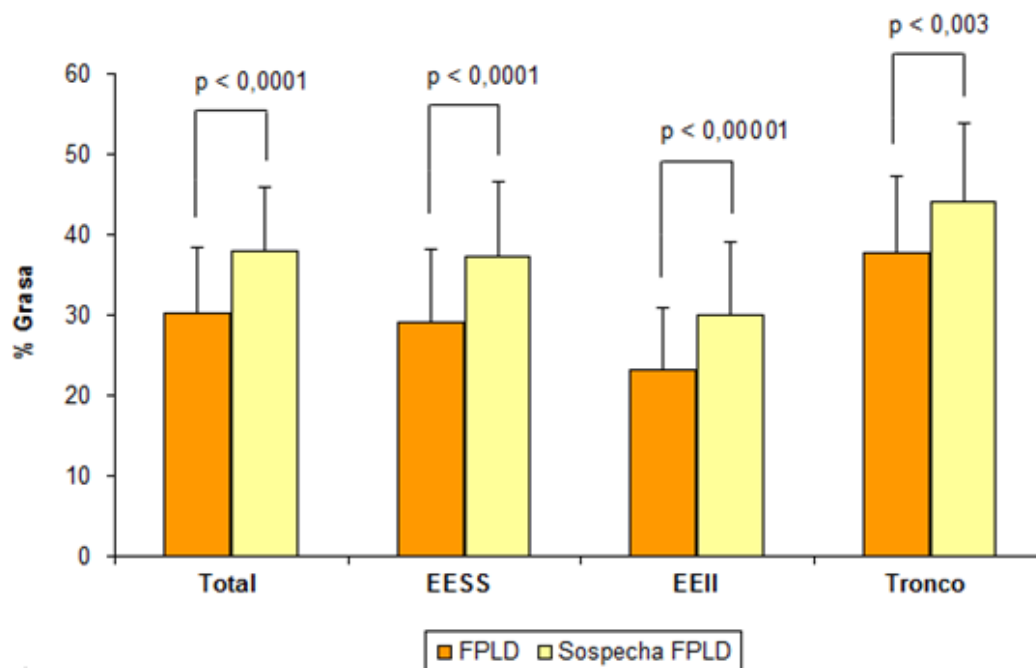


Figura 4.45: Distribución de la grasa corporal, determinada por DEXA, en las mujeres FPLD y el grupo con sospecha de FPLD. EESS, extremidades superiores; EEII, extremidades inferiores.

Tabla 4.33: Datos clínicos de las pacientes FPLD vs. pacientes con sospecha de FPLD.

	FPLD (n=26)	Sospecha FPLD (n=55)	p
DM2 %	35	61	0,05
Menopausia %	27	36	ns
Intolerancia HC %	69	73	ns
Dislipemia	62	75	ns
HLP %	74	82	ns
HLP IIa %	13	33	0.05
HLP IIb %	9	31	0.05
HLP IV %	52	16	0.001
HTA %	35	52	ns

HLP, hiperlipoproteinemia; HTA, hipertensión arterial; ns, no significativo.

Tabla 4.34: Datos bioquímicos de las pacientes FPLD vs. pacientes con sospecha de FPLD.

	FPLD (n=26)	Sospecha FPLD (n=55)	p
Glucosa (mg/dL)	144 ± 67	152 ± 81	ns
Hb A1c (%)	6.6 ± 18	7.0 ± 2.1	ns
Insulina (mUI/L)	22 ± 24	16 ± 16	ns
HOMA-IR	7.4 ± 7.4	5.9 ± 5.5	ns
Leptina (ng/ml)	6.8 ± 10	19 ± 19	0.0002
Col. Total (mg/dL)	200 ± 35	199 ± 58	ns
TG (mg/dL)	177 ± 110	178 ± 139	ns
Col. LDL (mg/dL)	115 ± 35	115 ± 42	ns
Col. HDL (mg/dL)	44 ± 16	43 ± 14	ns
Col. VLDL (mg/dL)	30 ± 15	32 ± 33	ns
Cortisol (ug/dL)	12 ± 6	18 ± 5	0,02
TSH (mUI/L)	1.6 ± 0.8	3.6 ± 7.4	ns
T3 libre (pg/mL)	3.1 ± 0.4	3.3 ± 0.7	ns
T4 libre (ng/dL)	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.4	ns
LH (UI/L)	15 ± 34	16 ± 13	ns
FSH (UI/L)	13 ± 17	27 ± 32	0.05
E2 (pg/mL)	41 ± 22	40 ± 47	ns
Testosterona (ng/mL)	0.39 ± 0.19	0.40 ± 0.24	ns
Creatinina (mg/dL)	1.19 ± 1.63	0.86 ± 0.24	ns
CK (UI/L)	143 ± 84	93 ± 63	ns
AST (UI/L)	18 ± 10	20 ± 21	ns
ALT (UI/L)	26 ± 22	29 ± 35	ns
GGT (UI/L)	20 ± 9	31 ± 36	ns
F Alcalina (UI/L)	122 ± 50	147 ± 46	ns
A Úrico (mg/dL)	5.3 ± 1.6	5.1 ± 1.4	ns
TNFalfa (pg/ml)	19 ± 23	14 ± 13	ns
IL6 (pg/ml)	5.2 ± 4.7	4.8 ± 5.5	ns
PCR (mg/dL)	1.7 ± 2.7	0.8 ± 1.3	ns

Hb A1C, hemoglobina glicosilada; HOMA-IR, "homeostasis model assessment-insulin resistance"; Col., colesterol; TG, triglicéridos; TSH, hormona estimulante del tiroides; T3, triyodotironina; T4, tiroxina; LH, hormona luteinizante; E2, estradiol; CK, creatinquinasa; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; FSH, hormona folículo-estimulante; GGT, gamma glutamil transpeptidasa; PCR, proteína C reactiva; IL6, interleuquina 6; ns, no significativo. Los datos representan las medias ± DS.

## 4.1.3.6. Pacientes\_FPLD clásica vs. FPLD atípica

Al comparar el grupo de mujeres FPLD atípica con respecto al grupo FPLD clásica se observó:

Mayor IMC, mayor perímetro de cintura, cadera y muslo (Tabla 4.34). La medición de los pliegues cutáneos (Figura 4.46), así como la determinación de la composición corporal de la grasa por DEXA (Tabla 4.35 y Figura 4.47) mostraron una mayor cantidad de grasa, tanto troncular como en las extremidades en el primer subgrupo de pacientes. Además, en este grupo fue mayor el porcentaje de DM2 y HTA (Tabla 4.36).

Tabla 4.35: Características antropométricas de las pacientes FPLD clásica vs. FPLD atípica.

	<b>FPLD clásica (n=20)</b>	<b>FPLDatípica (n=6)</b>	<b>p</b>
Edad (años)	37 ± 19	46 ± 10	ns
PAS (mmHg)	121 ± 10	135 ± 18	ns
PAD (mmHg)	79 ± 9	87 ± 11	ns
Peso (kg)	62 ± 8	76 ± 12	0.02
Talla (cm)	161 ± 8	159 ± 4	ns
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	23.8 ± 2	29.9 ± 4	0.01
Cintura (cm)	80 ± 9	100 ± 13	0.003
Cadera (cm)	88 ± 5	101 ± 8	0.004
Muslo (cm)	49 ± 3	53 ± 4	ns
WHR	0.90 ± 0.08	0.99 ± 0.07	0.03
Cint/muslo	1.66 ± 0.17	1.91 ± 0.21	0.05

PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; IMC, índice de masa corporal; WHR, "Waist-Hip ratio" (índice cintura-cadera); FPLD, lipodistrofia parcial familiar; ns, no significativo. Los datos representan las medias ± DS.

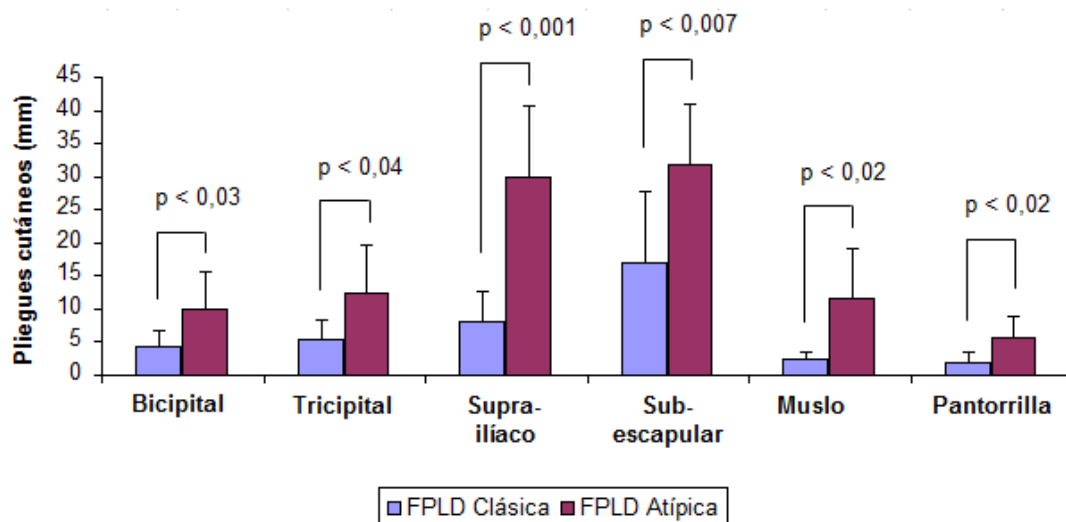


Figura 4.46: Pliegues cutáneos de varias regiones anatómicas de las mujeres con FPLD clásica y atípica.

Tabla 4.36: Composición corporal de las pacientes FPLD clásica vs. FPLD atípica, determinada por DEXA.

	FPLD clásica (n=8)	FPLD atípica (n=6)	p
Grasa Total (kg)	16 ± 2	25 ± 8	0.03
MLG total (kg)	46 ± 2	49 ± 6	ns
G. EESS (kg)	1.8 ± 0.1	2.6 ± 1.2	ns
MLG EESS (kg)	5,5 ± 0,3	5.9 ± 1.1	ns
G.EEII (kg)	4.1 ± 0.4	4.8 ± 2.3	ns
MLG EEII (kg)	14 ± 0	16 ± 2	ns
G.Tronco (kg)	10 ± 1	17 ± 6	0,03
MLG Tronco (kg)	22 ± 0	24 ± 3	ns
G. EE/Tronco	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.02

MGL, masa libre de grasa; MG, masa grasa; EESS, extremidades superiores; EEII, extremidades inferiores, ns, no significativo. Los datos representan las medias ± DS.

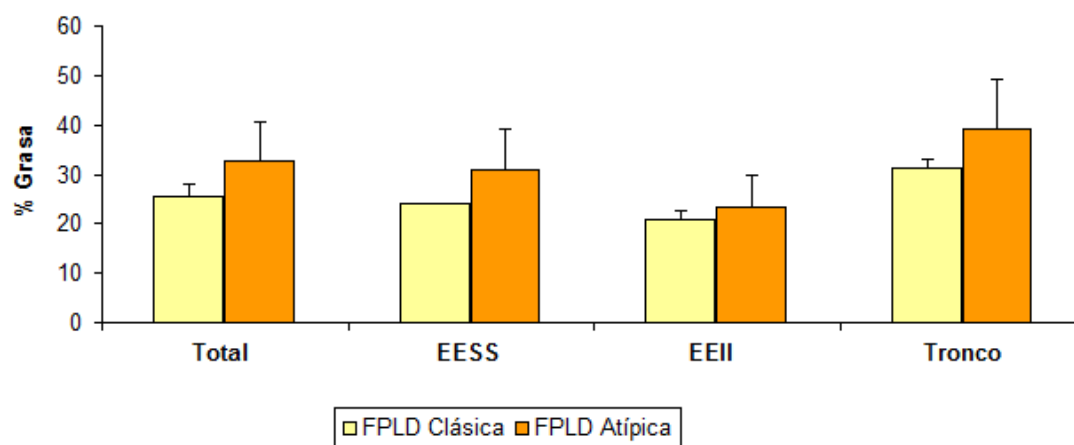


Figura 4.47: Distribución de la grasa corporal, determinada por DEXA, en las mujeres con FPLD clásica y atípica. EESS, extremidades superiores; EEII, extremidades inferiores.

Tabla 4.37: Datos clínicos de las pacientes FPLD clásica vs. FPLD atípica.

	FPLD clásica (n=20)	FPLD atípica (n=6)	p
Menopausia %	40	29	ns
DM2 %	13	57	0.05
HLP %	75	100	ns
HLP IIa %	9	17	ns
HLP IIb %	9	17	ns
HLP IV %	54	67	ns
HipertTG %	64	71	ns
HTA %	23	71	0.04

DM2, diabetes mellitus tipo 2; HLP, hiperlipoproteínemia; HipertTG, hipertrigliceridemia; HTA, hipertensión arterial; ns, no significativo.

Tabla 4.38: Datos bioquímicos de las pacientes FPLD clásica vs. FPLD atípica.

	FPLD clásica (n=20)	FPLD atípica (n=6)	p
Glucosa (mg/dL)	144 ± 74	137 ± 55	ns
Hb A1c (%)	5.9 ± 0.8	6.4 ± 1.6	ns
Insulina (mUI/L)	26.0 ± 33.7	16.7 ± 8.9	ns
HOMA-IR	7.6 ± 9.2	6.5 ± 5.7	ns
Leptina (ng/ml)	3 ± 2	6 ± 6	ns
Col. Total (mg/dL)	207 ± 30	183 ± 44	ns
TG (mg/dL)	193 ± 123	190 ± 96	ns
Col. LDL (mg/dL)	130 ± 25	100 ± 44	ns
Col. HDL (mg/dL)	41 ± 7	35 ± 11	ns
Col. VLDL (mg/dL)	25 ± 14	33 ± 17	ns
Cortisol (ug/dL)	10 ± 4	12 ± 6	ns
TSH (mUI/L)	1.3 ± 0.5	2.1 ± 0.9	ns
T3 libre (pg/mL)	3.3 ± 0.3	3.1 ± 0.4	ns
T4 libre (ng/dL)	1.2 ± 0.3	1.1 ± 0.2	ns
LH (UI/L)	25 ± 52	9 ± 8	ns
FSH (UI/L)	15 ± 24	12 ± 13	ns
E2 (pg/mL)	47 ± 8	42 ± 27	ns
Testosterona (ng/mL)	0.45 ± 0.23	0.36 ± 0.11	ns
Creatinina (mg/dL)	1.5 ± 2.3	0.87 ± 0.18	ns
CK (UI/L)	146 ± 95	139 ± 80	ns
AST (UI/L)	21 ± 15	14 ± 3	ns
ALT (UI/L)	28 ± 31	22 ± 6	ns
GGT (UI/L)	20 ± 10	21 ± 10	ns
F Alcalina (UI/L)	102 ± 59	142 ± 38	ns
A Úrico (mg/dL)	5.4 ± 1.7	5.5 ± 1.7	ns
TNFalfa (pg/ml)	12.6 ± 5.2	16.4 ± 10.0	ns
IL6 (pg/ml)	7.5 ± 4.9	3.7 ± 4.4	ns
PCR (mg/dL)	0.6 ± 0.9	1.0 ± 1.7	ns

Hb A1C, hemoglobina glicosilada; HOMA-IR, "homeostasis model assessment-insulin resistance"; Col., colesterol; TG, triglicéridos; TSH, hormona estimulante del tiroides; T3, triyodotironina; T4, tiroxina; LH, hormona luteinizante; E2, estradiol; CK, creatinquinasa; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; FSH, hormona folículo-estimulante; GGT, gamma glutamil transpeptidasa; PCR, proteína C reactiva; IL6, interleuquina 6; ns, no significativo. Los datos representan las medias ± DS.



## 4.1.3.7. Pacientes con alta sospecha de FPLD vs. baja sospecha de FPLD

Al comparar el grupo de mujeres con baja sospecha de FPLD con respecto al de alta sospecha de FPLD (ver SUJETOS Y MÉTODOS, Tabla 3.1), en función del porcentaje de grasa en EEII, se observó:

Mayor IMC, mayor perímetro de cintura, cadera y muslo (Tabla 4.39). La medición de los pliegues cutáneos (Figura 4.48), así como la determinación de la composición corporal de la grasa por DEXA (Tabla 4.40 y Figura 4.49) mostraron una mayor cantidad de grasa, tanto troncular como en las extremidades. Además, en este grupo fue menor el porcentaje de hiperlipidemia de tipo IIa (Tabla 4.41) y fueron menores los niveles de glucosa basal (Tabla 4.42).

Tabla 4.39: Características antropométricas de las pacientes con alta sospecha de FPLD vs. baja sospecha de FPLD.

	<b>Alta sospecha de FPLD (n=25)</b>	<b>Baja sospecha de FPLD(n=30)</b>	<b>p</b>
Edad (años)	55 ± 11	49 ± 12	ns
PAS (mmHg)	137 ± 16	140 ± 18	ns
PAD (mmHg)	78 ± 10	86 ± 9	0.007
Peso (kg)	76 ± 9	85 ± 11	0.004
Talla (cm)	153 ± 7	156 ± 5	ns
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	32.8 ± 4	35.1 ± 4	0.08
Cintura (cm)	104 ± 8	111 ± 8	0.01
Cadera (cm)	103 ± 7	107 ± 7	0.05
Muslo (cm)	52 ± 5	58 ± 6	0,002
WHR	1.02 ± 0.06	1.04 ± 0.06	ns
Cint/muslo	1.99 ± 0.18	1.93 ± 0.18	ns

PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; IMC, índice de masa corporal; WHR, "Waist-Hip ratio" (Índice cintura-cadera); FPLD, lipodistrofia parcial familiar; ns, no significativo. Los datos representan las medias ± DS.

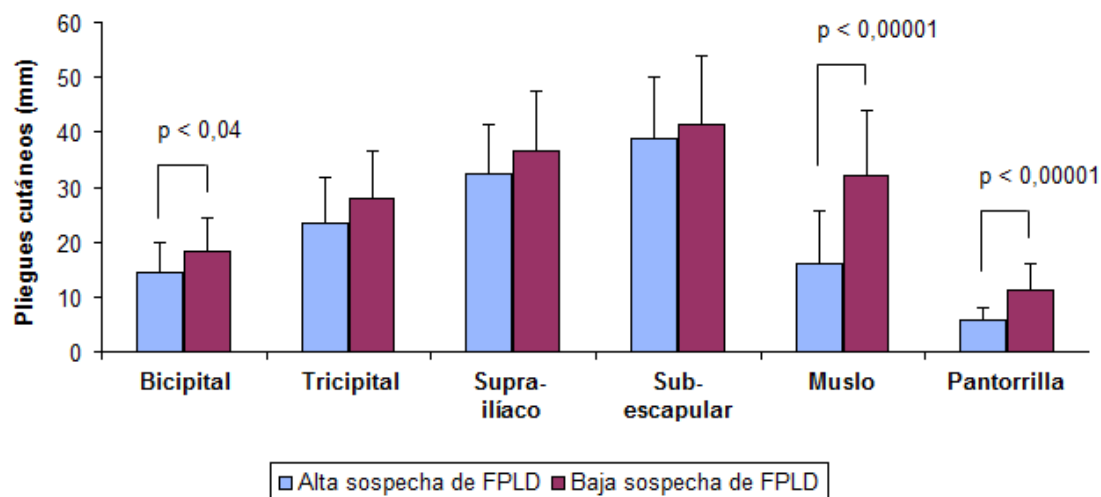


Figura 4.48: Pliegues cutáneos de varias regiones anatómicas de las mujeres con alta o baja sospecha de FPLD.

Tabla 4.40: Composición corporal (grasa) de las pacientes con alta sospecha de FPLD vs. baja sospecha de FPLD, determinada por DEXA.

	Alta sospecha de FPLD (n=18)	Baja sospecha de FPLD (n=15)	p
Grasa Total (kg)	30 ± 5	37 ± 6	0.0007
MLG total (kg)	44 ± 5	42 ± 6	ns
G. EESS (kg)	3.4 ± 0.6	4.0 ± 1.0	ns
MLG EESS (kg)	4.9 ± 0.7	4.6 ± 0.8	ns
G.EEII (kg)	6.0 ± 1.8	9.1 ± 2.0	0.00003
MLG EEII (kg)	14 ± 2	13 ± 3	ns
G.Tronco (kg)	19 ± 4	23 ± 5	0.02
MLG Tronco (kg)	22 ± 3	21 ± 3	ns
G. EE/Tronco	0.50 ± 0.1	0.59 ± 0.1	0.04

MGL, masa libre de grasa; MG, masa grasa; EESS, extremidades superiores; EEII, extremidades inferiores; ns, no significativo. Los datos representan las medias ± DS.

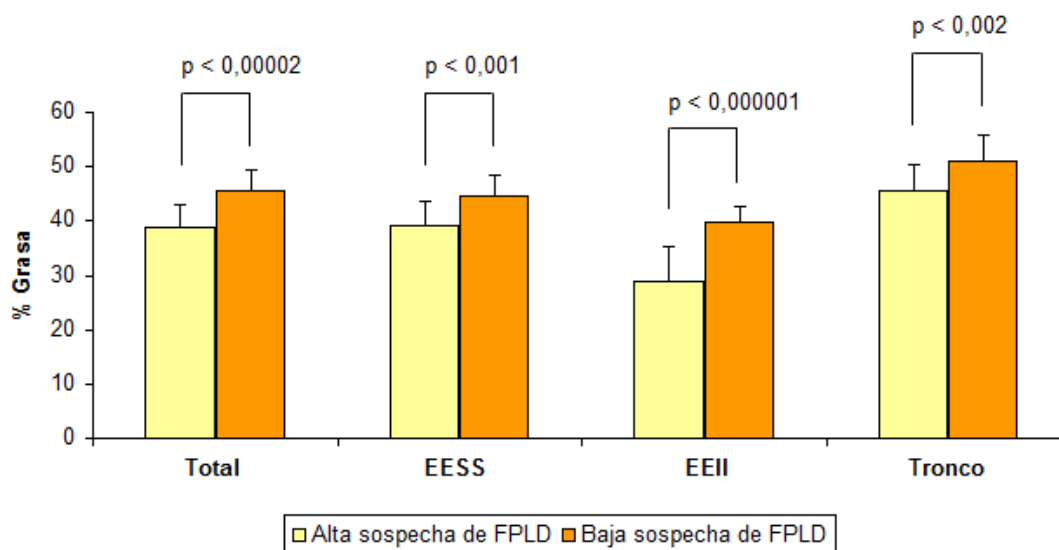


Figura 4.49: Distribución de la grasa corporal, determinada por DEXA, en las mujeres con alta o baja sospecha de FPLD. EESS, extremidades superiores; EEII, extremidades inferiores.

Tabla 4.41: Datos clínicos de las pacientes con alta sospecha de FPLD vs. baja sospecha de FPLD.

	Alta sospecha de FPLD (n=25)	Baja sospecha de FPLD (n=30)	p
Menopausia %	76	44	ns
HLP %	81	76	ns
HLP IIa %	52	20	0.02
HLP IIb %	24	32	ns
HLP IV %	5	24	ns
HipertTG %	29	56	ns
HTA %	48	62	ns

HLP, hiperlipoproteinemia; HipertTG:hipertrigliceridemia; HTA, hipertensión arterial; ns, no significativo.

Tabla 4.42: Datos bioquímicos de las pacientes con alta sospecha vs. baja sospecha de FPLD.

	<b>Alta sospecha de FPLD (n=25)</b>	<b>Baja sospecha de FPLD (n=30)</b>	<b>p</b>
Glucosa (mg/dL)	176 ± 97	127 ± 56	0.05
Hb A1c (%)	7.6 ± 2.0	6.7 ± 1.8	ns
Insulina (mUI/L)	14.4 ± 10.4	12.8 ± 12.4	ns
HOMA-IR	6.1 ± 4.4	3.8 ± 4.0	ns
Leptina (ng/ml)	21 ± 9	30 ± 21	ns
Col. Total (mg/dL)	197 ± 89	199 ± 34	ns
TG (mg/dL)	177 ± 194	161 ± 107	ns
Col. LDL (mg/dL)	115 ± 55	119 ± 34	ns
Col. HDL (mg/dL)	40 ± 12	47 ± 19	ns
Col. VLDL (mg/dL)	37 ± 44	28 ± 18	ns
Cortisol (ug/dL)	18 ± 6	17 ± 5	ns
TSH (mUI/L)	5.3 ± 11.2	2.3 ± 1.8	ns
T3 libre (pg/mL)	3.2 ± 1.1	3.4 ± 0.4	ns
T4 libre (ng/dL)	1.3 ± 0.6	1.2 ± 0.2	ns
LH (UI/L)	17 ± 13	16 ± 13	ns
FSH (UI/L)	27 ± 25	28 ± 13	ns
E2 (pg/mL)	27 ± 27	43 ± 45	ns
Testosterona (ng/mL)	0.47 ± 0.36	0.35 ± 0.13	ns
Creatinina (mg/dL)	0.93 ± 0.34	0.81 ± 0.10	ns
CK (UI/L)	106 ± 72	71 ± 37	ns
AST (UI/L)	17 ± 8	22 ± 29	ns
ALT (UI/L)	22 ± 9	34 ± 48	ns
GGT (UI/L)	28 ± 40	36 ± 35	ns
F Alcalina (UI/L)	146 ± 54	150 ± 42	ns
A Úrico (mg/dL)	5.3 ± 1.8	4.9 ± 1.1	ns
TNFalfa (pg/ml)	11 ± 3	10 ± 4	ns
IL6 (pg/ml)	3.6 ± 3.0	4.0 ± 3.5	ns
PCR (mg/dL)	0.5 ± 0.2	1.0 ± 1.8	ns

Hb A1C, hemoglobina glicosilada; HOMA-IR, "homeostasis model assessment-insulin resistance"; Col., colesterol; TG, triglicéridos; TSH, hormona estimulante del tiroides; T3, triyodotironina; T4, tiroxina; LH, hormona luteinizante; E2, estradiol; CK, creatinquinasa; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa; FSH, hormona folículo-estimulante; GGT, gamma glutamil transpeptidasa; PCR, proteína C reactiva; IL6, interleuquina 6; ns, no significativo. Los datos representan las medias ± DS.

## 4.2. ESTUDIO FUNCIONAL DE LA MUTACIÓN C591F

El estudio *in vitro* de *LMNA* C591F, una de las mutaciones encontradas en nuestros pacientes que no había sido descrita previamente, reveló que en la mayoría (90%) de las células 3T3-L1 en las cuales se sobre-expresó la lamina A mutada (C591F-FLAG-LA) el tamaño del núcleo estaba aumentado en aproximadamente un 15%, con invaginaciones en la lámina nuclear y agregación anormal de la lamina tipo A. Sin embargo, en las células transfectadas con la lamina A *wild-type* (FLAG-WT-LA), la tinción con anti-FLAG mostró núcleos normales y una organización normal de la lamina A en la lámina nuclear (Figura 4.50). La tinción con DAPI permitió observar núcleos agrandados con un número menor de agrupamientos de heterocromatina en las células que expresaban la lamina A mutada, respecto a las células que expresaban la lamina A *wild-type* (Figura 4.50 A). En los preadipocitos que expresaban la lamina A mutada (C591F-FLAG-LA), antes y después de la diferenciación, se observó una señal más intensa de prelamina A (Figura 4.50 B), detectada por anticuerpos anti-prelamina A.

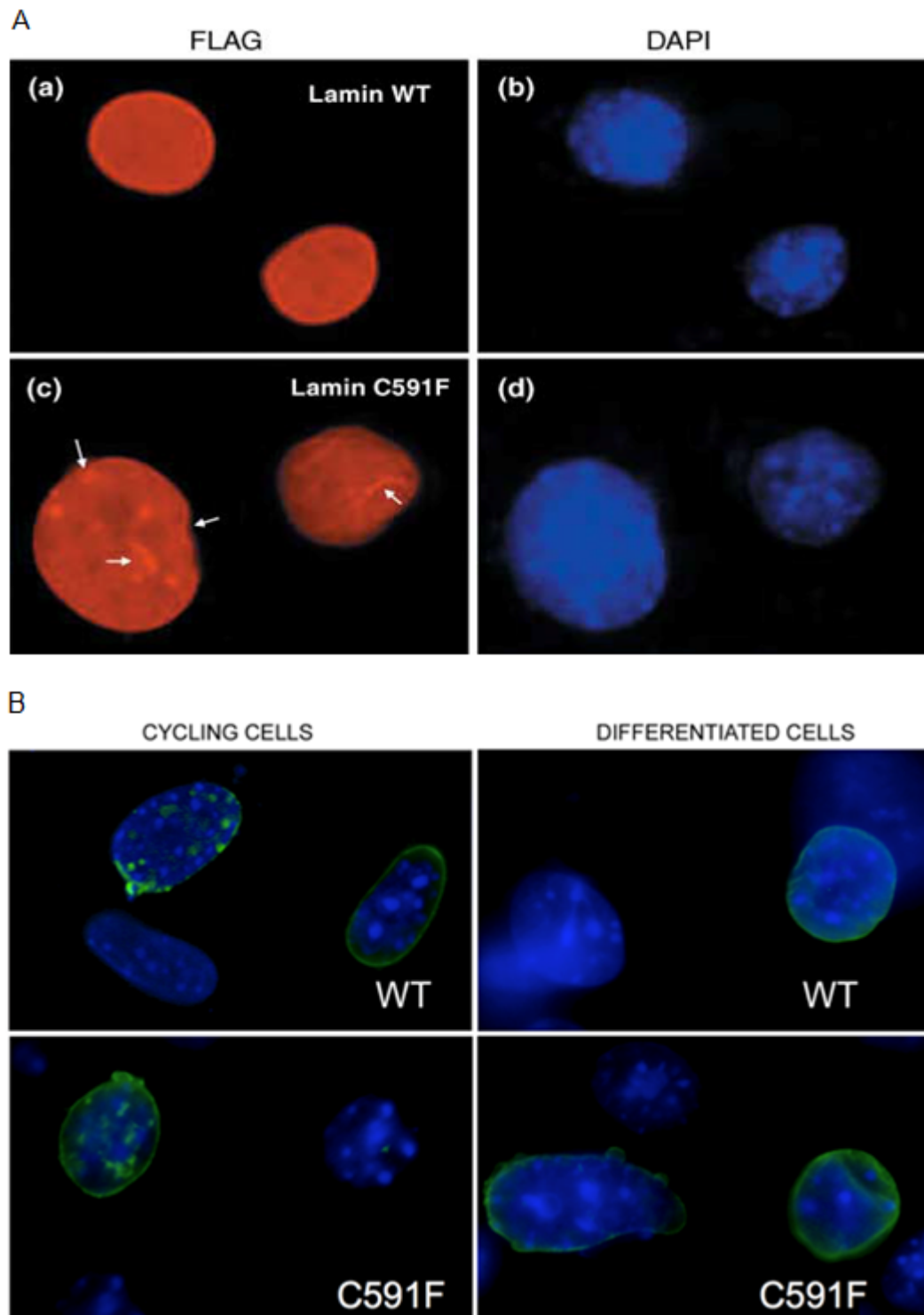


Figura 4.50: Preadipocitos 3T3-L1 transfectedados con pCMV6-XL5 conteniendo los ADNcs de FLAG-LMNA *wild-type* o FLAG-LMNA C591F. A: Los preadipocitos fueron tratados con medio de diferenciación durante 2 días, fijados y teñidos con DAPI (tinción para ADN) [en azul (b, d)] y con anticuerpos anti-FLAG [en rojo (a, c)]; posteriormente fueron analizados por microscopía de inmunofluorescencia convencional. En las células transfectedadas con FLAG-LMNA C591F se observaron invaginaciones en la lámina nuclear y agregación anormal de lamina tipo A (ver fechas) (c). B: Preadipocitos antes y después de la diferenciación, teñidos con DAPI (en azul) y con anticuerpos anti-prelamina A (en verde). En las células transfectedadas con FLAG-LMNA C591F se observan invaginaciones de la lámina nuclear y una señal más intensa de prelamin A.

### **4.3. ESTUDIOS ULTRAESTRUCTURALES Y MOLECULARES EN MUESTRAS DE TEJIDO ADIPOSO PROCEDENTES DE PACIENTES CON FPLD2**

Con el fin de buscar las posibles alteraciones que podrían estar causando una distribución anormal de la grasa corporal en los pacientes con FPLD2, se realizaron estudios ultraestructurales, de expresión génica y proteica en distintas muestras de tejido adiposo procedentes de dos grupos diferentes de estos pacientes.

#### **4.3.1. ESTUDIO DEL TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO DE PACIENTES CON LA FORMA CLÁSICA DE FPLD2**

En un grupo de 7 pacientes con FPLD2 clásica se realizaron los estudios en muestras de TAsc procedente de abdomen y de muslo, que nos permitieran comparar y buscar una explicación a la pérdida específica de cada región de TAsc que se produce en estos pacientes.

##### **4.3.1.1. Evaluación clínica de los pacientes**

La evaluación clínica de los pacientes con FPLD2 reveló que estos individuos presentaban un menor porcentaje de tejido adiposo (Tabla 4.43). En cuanto a los parámetros bioquímicos, los pacientes con lipodistrofia mostraron ser hipoleptinémicos con niveles en plasma de triglicéridos y TNF- $\alpha$  significativamente superiores a los del grupo control (Tabla 4.43). Los pacientes con lipodistrofia presentaron una sensibilidad a la insulina significativamente menor que los individuos controles (Tabla 4.43).

Tabla 4.43: Características fenotípicas de los pacientes

	Control (n=10)	FPLD2 (n=7)	Valor p
<i>Datos clínicos y antropométricos</i>			
Sexo (M/F)	7/3	5/2	ns
Edad (años)	39 ± 13	41 ± 13	ns
Talla (cm)	170 ± 7	173 ± 8	ns
Peso (kg)	80 ± 19	83 ± 20	ns
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	27.5 ± 8.8	27.4 ± 8.1	ns
Cintura (cm)	97 ± 19	88 ± 14	ns
Caderas (cm)	110 ± 16	92 ± 18	0.019
PAS (mmHg)	127 ± 20	133 ± 19	ns
PAD (mmHg)	78 ± 13	83 ± 8	ns
PC Tricipital (mm)	28 ± 17	9 ± 5	0.005
PC Bicipital (mm)	20 ± 14	7 ± 3	0.031
PC Subescapular (mm)	34 ± 14	24 ± 7	ns
PC Suprailíaco (mm)	28 ± 13	10 ± 2	0.002
MGL (kg)	50.0 ± 7.8	59.6 ± 8.4	ns
% MGL	64 ± 10	76 ± 7	0.006
MG (kg)	30.1 ± 14.7	20.3 ± 9.1	ns
% MG	36 ± 10	24 ± 7	0.006
<i>Parámetros bioquímicos y del metabolismo de la glucosa</i>			
Glucosa basal (mg/dL)	95.4 ± 20	127.8 ± 29	0.05
Insulina basal (mUI/L)	8.6 ± 7.8	13.8 ± 7.8	ns
Leptina (ng/mL)	11.7 ± 14.4	2.32 ± 2.37	0.05
Colesterol total (mg/dL)	205 ± 31	197 ± 39	ns
Triglicéridos (mg/dL)	85 ± 35	200 ± 97	0.03
Colesterol LDL (mg/dL)	139 ± 27	128 ± 46	ns
Colesterol HDL (mg/dL)	50 ± 12	35 ± 15	ns
IL-6 (pg/mL)	2.82 ± 1.31	1.96 ± 0.67	ns
TNF-alfa (pg/mL)	4.56 ± 2.17	7.72 ± 4.37	0.05
HOMA	2.45 ± 1.8	4.70 ± 1.54	0.04
Ln índice HOMA	0.7 ± 0.7	1.5 ± 0.4	0.01
Índice SI, (E-5(1/(min(pmol/L)))	3.4 ± 2.1	1.6 ± 0.7	0.05
Ln índice SI	1.6 ± 0.7	0.9 ± 0.5	0.04

IMC, índice de masa corporal; PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica; PC, pliegue cutáneo; MGL, masa libre de grasa; MG, masa grasa; LDL, "low-density lipoprotein"; HDL, "high-density lipoprotein"; HOMA, "homeostasis model assessment"; IL, interleuquina; TNF, "tumour necrosis factor"; SI, sensibilidad a la insulina; FPLD2, lipodistrofia parcial familiar tipo 2; ns, no significativo, Ln: Logaritmo neperiano. Los datos representan las medias ± DS.



#### 4.3.1.2. Expresión génica en muestras de tejido adiposo

La expresión relativa de ARNm de *LMNA* y *SREBP1c* (analizada por RT-PCR en tiempo real, ver en SUJETOS Y MÉTODOS, sección 3.2.6.2), en el TA de ambas localizaciones anatómicas, fue similar en los dos grupos (Figura 4.51). La expresión relativa de *PPARG2* y *LPL* en TA de muslo fue notable y significativamente menor (67% y 66% respectivamente) en pacientes con lipodistrofia (Figura 4.51). La expresión de ARNm de *RBI*, *CCND3*, *CCND1*, *SLC2A4* y *FTO* fue también significativamente menor en TA de muslo de los pacientes con FPLD2 (20%, 38%, 45%, 56% y 33% respectivamente) (Figura 4.51). La expresión de *CCND1* y *SLC2A4* fue además menor en el TAsc abdominal de los pacientes con FPLD2 (39% y 46% respectivamente). No se encontraron otros cambios en la expresión de los genes estudiados en el TA abdominal (Figura 4.51).

Al comparar la expresión génica relativa del TA abdominal y de muslo (Tabla 4.44), se observó una mayor expresión de *CCND3* y *CCND1* en muslo tanto en controles (164% y 241% respectivamente) como en pacientes con lipodistrofia (50% y 182% respectivamente). No se encontraron diferencias entre el TA abdominal y de muslo para la expresión del gen *LPL* en controles, sin embargo, en los pacientes con lipodistrofia se observó una reducción del 62% en la expresión de este gen en muslo.

Los genes *RBI* y *FTO* presentaron un menor nivel de expresión (20% y 19% respectivamente) en TA de muslo de pacientes con lipodistrofia. No se encontraron diferencias significativas entre abdomen y muslo para la expresión relativa de los genes *LMNA*, *SREBP1c* y *SLC2A4* en controles y pacientes.

La proporción de expresión génica relativa abdomen: muslo fue significativamente diferente entre controles y pacientes para *CCND3*, *RBI*, *PPARG2*, *LPL* y *FTO* (Figura 4.51). Estos cinco genes tuvieron menor expresión en el TA de muslo en pacientes con FPLD2.

Con el fin de valorar la contribución en la expresión génica de otros tipos de células presentes en las muestras de tejido adiposo, se cuantificó la expresión relativa del gen *LPL* (un marcador de tejido adiposo maduro) en fibroblastos tanto de controles como de pacientes lipodistróficos, siendo 100 000 veces menor que en el TA de ambos.

Tabla 4.44: Expresión génica relativa en tejido adiposo de abdomen y muslo

Genes	Abdomen	Muslo	$\Delta\%$	Valor p
<i>Controles</i>				
CCND3	1.1 $\pm$ 0.5	2.9 $\pm$ 2.4	164	0.0001
CCND1	1.2 $\pm$ 0.9	4.1 $\pm$ 1.5	241	0.0001
RB1	1.0 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.3	10	ns
PPARG2	1.1 $\pm$ 0.4	2.7 $\pm$ 1.0	145	0.004
LPL	1.2 $\pm$ 0.8	0.97 $\pm$ 0.4	-19	ns
SLC2A4	1.3 $\pm$ 0.2	0.90 $\pm$ 0.5	-30	ns
SREBP1c	1.0 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.7	20	ns
LMNA	1.0 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.4	20	ns
FTO	1.0 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.8	20	ns
<i>Pacientes con FPLD2</i>				
CCND3	1.0 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.6	50	0.02
CCND1	1.1 $\pm$ 0.3	3.1 $\pm$ 0.8	182	0.0001
RB1	1.0 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.2	-20	0.006
PPARG2	1.1 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.3	0	ns
LPL	1.3 $\pm$ 0.8	0.5 $\pm$ 0.1	-62	0.001
SLC2A4	1.6 $\pm$ 1.3	1.0 $\pm$ 0.4	-38	ns
SREBP1c	1.1 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.7	9	ns
LMNA	1.1 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.4	-10	ns
FTO	1.0 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.2	-19	0.005

$\Delta\%$ , porcentaje de incremento; FPLD2, lipodistrofia parcial familiar tipo 2; ns, no significativo. Los datos representan las medias  $\pm$  DS.

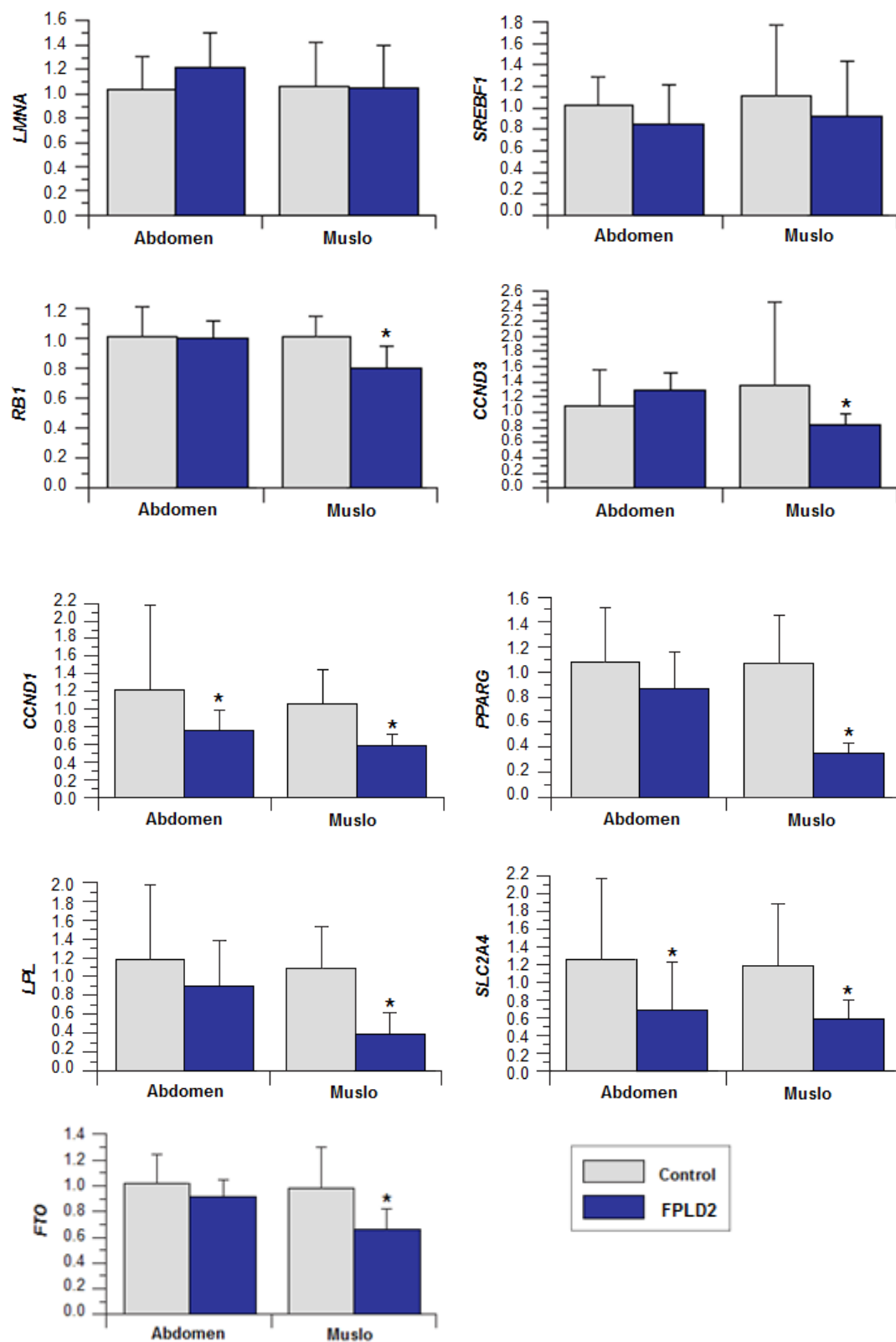


Figura 4.51: Representación gráfica de la expresión génica relativa de *LMNA*, *SREBF1*, *PPARG*, *RB1*, *CCND3*, *CCND1*, *LPL*, *SLC2A4* y *FTO* en tejido adiposo subcutáneo procedente de abdomen y muslo de un grupo de pacientes con FPLD2 (barras azules) y un grupo control (barras grises), cuantificada por RT-PCR en tiempo real y normalizada con la expresión del ARNm de *POLR2A*. Los datos representan las medias  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ .

#### 4.3.1.3. Expresión de prelamina A en muestras de tejido adiposo, evaluada por western blot e inmunofluorescencia

El análisis por Western blot reveló una banda tenue de prelamina A en el TA control de muslo (Figura 4. 52 A) y una banda más intensa en TA de abdomen. La cantidad de prelamina A se vio incrementada en el TA de R482W (pacientes con lipodistrofia) tanto de muslo como de abdomen comparada con los controles, mientras que los niveles de emerina no fueron significativamente diferentes (Figura 4. 52 A). El análisis densitométrico de las bandas reveló un incremento significativo en la cantidad de prelamina A en el TA de muslo de los pacientes con FPLD2 al compararla con los controles (Figura 4.52 B).

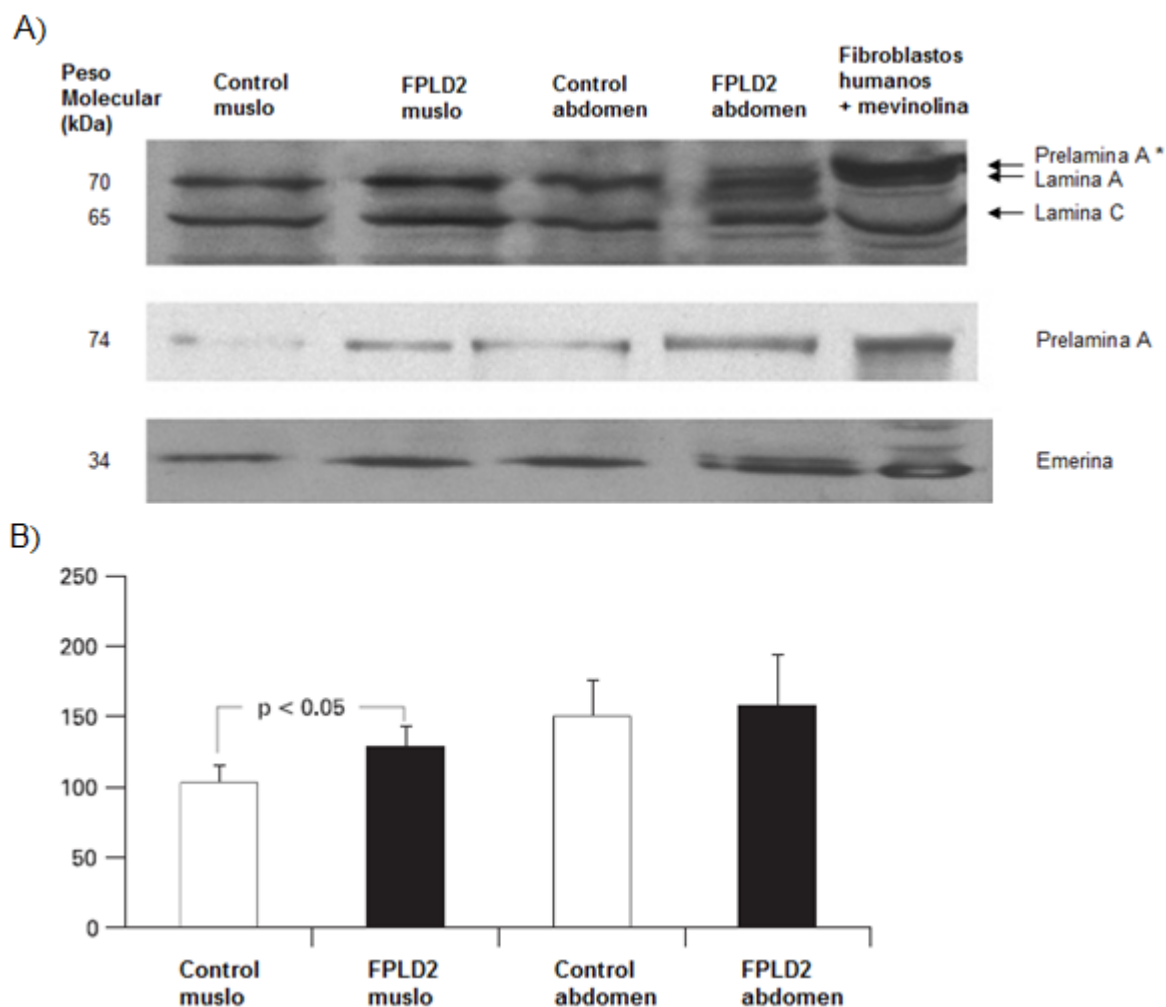


Figura 4.52: Análisis por Western blot de la expresión de lamina A/C y prelamina A en tejido adiposo de pacientes con FPLD2 y controles. A) Revelado de las bandas de proteínas. Se utilizó una muestra de fibroblastos humanos tratados con mevinolina 20 mmol/L, como referencia de peso molecular de la prelamina A. Como control de carga, se utilizaron las bandas obtenidas por la detección de emerina. Utilizando el anticuerpo policlonal anti-lamina A/C se detectó prelamina A (\*) sólo en los fibroblastos tratados y en el TA abdominal de los pacientes. Se partió de un extracto de proteínas nucleares que se resolvieron en un gel de SDS-PAGE al 8%. B) Análisis densitométrico de las bandas de prelamina A en las muestras de tejido adiposo, a partir de la cuantificación de tres análisis de Western blot independientes. Los datos representan las medias (SD). Se encontraron diferencias significativas (determinadas por la prueba "t de Student") sólo en las muestras procedentes de muslo.

El marcaje de prelamina A con inmunofluorescencia mostró una tinción intensa del borde o anillo nuclear en el TAsc de muslo de los pacientes, mientras que este precursor de la proteína lamina A fue apenas detectable en el TA de muslo de los controles (Figura 4.53). Estos hallazgos fueron similares en TAsc de abdomen (Figura 4.53).

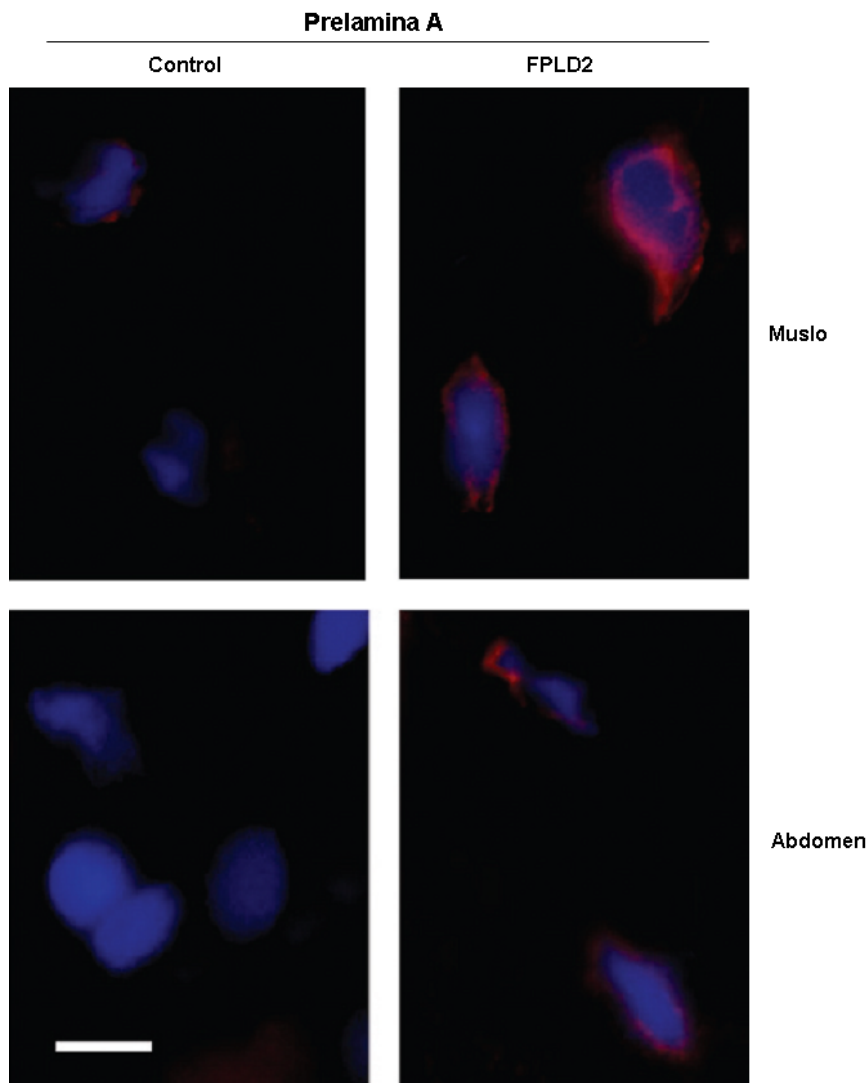


Figura 4.53: Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de prelamina A en tejido adiposo de pacientes con FPLD2 o controles. Prelamina A marcada con anticuerpo específico (Santa Cruz SC-6214) y revelada con anticuerpo secundario anti-IgG de cabra conjugado con isotiocianato tetrametil rodamina (rojo). Tinción del núcleo contrastada con DAPI (azul). Imagen representativa de tres inmunotinciones. Barra, 5  $\mu$ m.

#### 4.3.1.4. Estudio de ultraestructuras celulares por microscopía electrónica

Los estudios ultraestructurales revelaron que a diferencia del TA normal, los adipocitos de FPLD2 mostraban defectos en la capa nuclear periférica de heterocromatina periférica adyacente a la membrana nuclear (Figura 4.54). Este hallazgo también se observó en fibroblastos y células endoteliales del TA tanto de muslo como de abdomen. En estos tipos de células estuvo además presente de forma variable una lámina nuclear densa y fibrosa, pero más frecuente en fibroblastos y células endoteliales (en muestras de abdomen y de muslo) que en adipocitos; las muestras de FPLD2 que mostraron esta característica en adipocitos sólo fueron las procedentes de muslo (Figura 4.54).

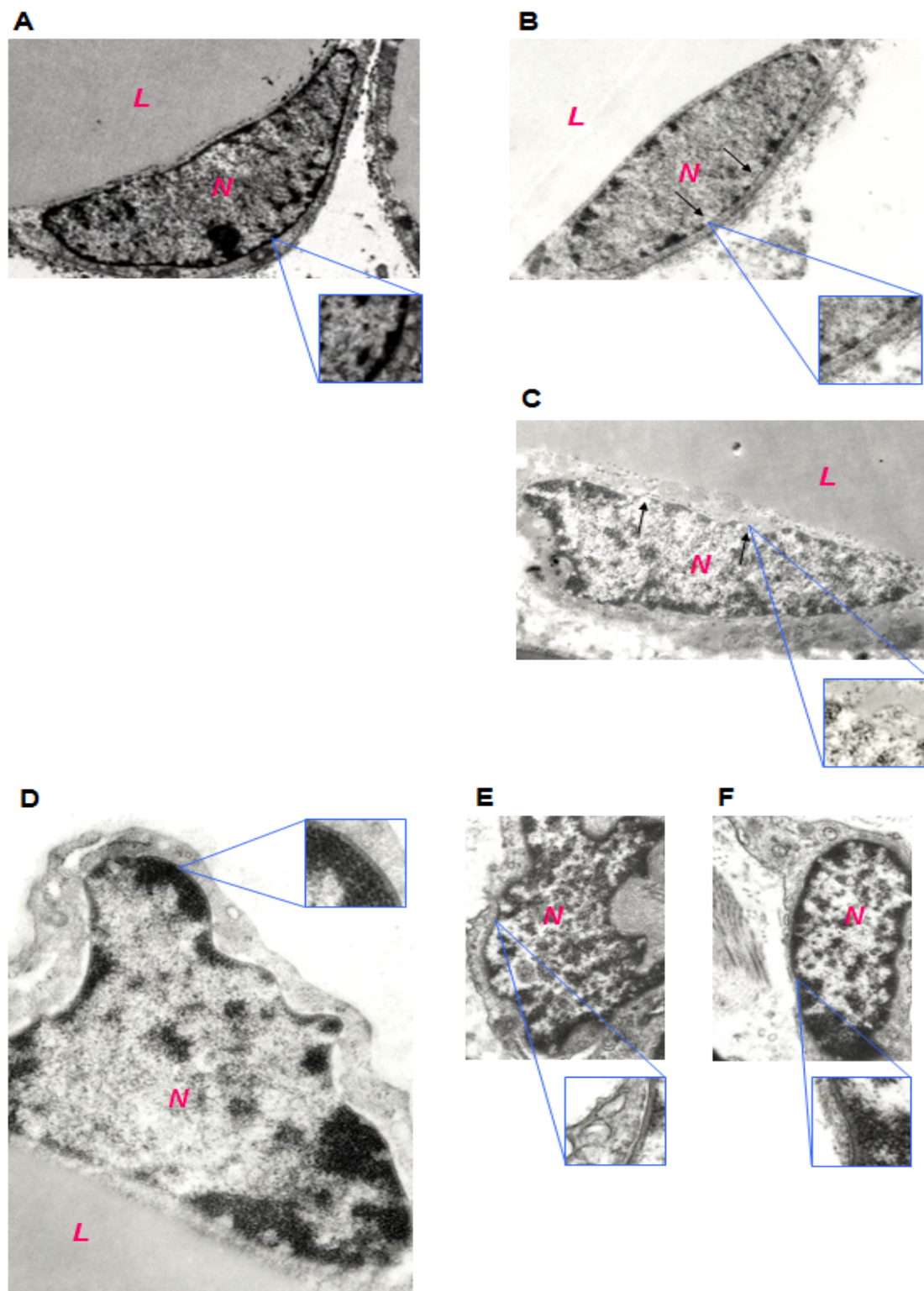


Figura 4.54: Microscopía electrónica. A: Adipocito normal con heterocromatina periférica continua a lo largo del contorno nuclear; B y C: adipocitos de muslo (B) y abdomen (C) de un paciente con FPLD2, con áreas desprovistas de heterocromatina en la periferia nuclear; D: adipocitos de muslo de un paciente con FPLD2, muestra la presencia de una lamina fibrosa densa en el núcleo; E: célula endotelial y F: fibroblasto del tejido adiposo de pacientes con FPLD2, ambas muestran la lamina fibrosa densa. Visión ampliada en los cuadros a la derecha de cada imagen. N, núcleo; L, gota lipídica.

Al integrar los resultados obtenidos en esta parte de nuestro estudio, se observó una correlación significativa entre la sensibilidad a la insulina ( $S_I$ , Modelo Mínimo) y la expresión relativa del gen *RB1* en el TA periférico ( $r=0.74$ ,  $p<0.001$ ). La proporción abdomen: muslo para la expresión del gen *RB1* se correlacionó negativamente con el índice  $S_I$  ( $r=-0.61$ ,  $p<0.01$ ). La expresión relativa del gen *PPARG2* en TA de muslo también correlacionó con los índices de sensibilidad a la insulina, pero el coeficiente de correlación fue menor ( $r=0.51$ ,  $p=0.039$  para el índice  $S_I$  y  $r=-0.56$ ,  $p<0.02$  para HOMA-IR).

#### 4.3.2. ESTUDIO DE LA LIPOMATOSIS ASOCIADA A LA FPLD2

En otro grupo de 4 pacientes con FPLD2 se estudiaron muestras de lipomas y tejido adiposo peri-lipoma, con el propósito de buscar las bases moleculares que determinan esta otra alteración del tejido adiposo en algunos pacientes lipodistróficos.

##### 4.3.2.1. Estudios histológicos

El tejido lipomatoso teñido con hematoxilina-eosina mostró las características típicas del TA blanco. No se observaron características histológicas de grasa parda. Este tejido fue similar al TA peri-lipoma tanto en las muestras de pacientes lipodistróficos como de sujetos controles (Figura 4.55 A).

El estudio morfométrico reveló que los adipocitos procedentes de lipomas eran significativamente más grandes que los adipocitos de grasa peri-lipoma tanto en controles como en pacientes lipodistróficos. Llamativamente, el tamaño medio de los adipocitos lipodistróficos fue significativamente mayor que el de los controles. (Figura 4.55 B).

Los estudios de inmunohistoquímica revelaron lo siguiente:

Los macrófagos marcados con CD68 (CD68+) se encontraron en TA tanto de lipomas como de muestras peri-lipoma de sujetos lipodistróficos, sin embargo fueron muy escasos en sujetos controles donde la distribución fue fundamentalmente difusa. En las muestras lipodistróficas estas células aparecieron tanto dispersas como rodeando a los adipocitos. En las muestras de estos pacientes se observó también que los macrófagos se disponían alrededor de los adipocitos, adoptando forma de corona (“crown-like structures”), una característica de la fagocitosis de adipocitos por infiltración de macrófagos. Esta disposición alrededor de los adipocitos parece ser más frecuente en grasa de lipoma que de peri-lipoma en pacientes lipodistróficos (Figure 4.52 C).



Se encontraron más linfocitos CD3+ con una disposición difusa y perivascular en lipomas lipodistróficos en comparación con las demás muestras. En el resto de las muestras, los linfocitos T CD3+ fueron escasos con distribución perivascular (Figura 4.55 D).

La proporción de células proliferantes Ki67+ fue significativamente mayor en lipomas de pacientes lipodistróficos que en lipomas de sujetos controles ( $2.75 \pm 0.96\%$  vs.  $0.25 \pm 0.5\%$ ,  $p < 0.007$ ).

Los linfocitos B (CD20+) y las células plasmáticas (CD138+) fueron prácticamente inexistentes en todas las muestras analizadas.

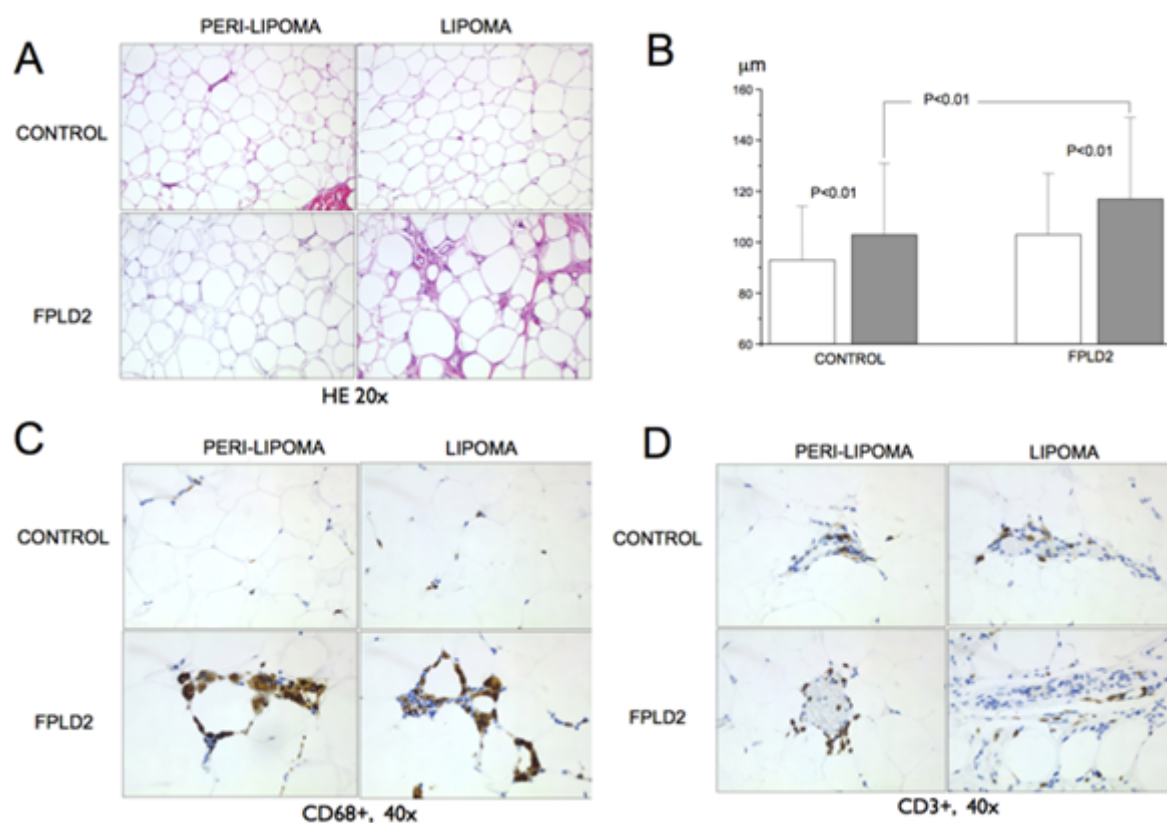


Figura 4.55: Hallazgos histológicos e inmunohistoquímicos en muestras representativas de lipoma y peri-lipoma. A: Tinción con hematoxilina-eosina que muestra la apariencia típica del TA blanco en ambos tejidos. B: Estudio morfométrico. Los adipocitos de lipomas (barras en gris) fueron más grandes que los adipocitos de grasa peri-lipomatosa (barras en blanco), y los adipocitos de muestras lipodistróficas fueron más grandes que los procedentes de las muestras de grasa control. C: Inmunohistoquímica para CD68. Las células CD68+ (macrófagos) rodeando a numerosos adipocitos, en forma de estructuras en corona, frecuentemente presentes en TA lipodistrófico. D: Inmunohistoquímica para linfocitos T CD3. Aparecen más linfocitos CD3+ en lipomas lipodistróficos con una distribución difusa y perivascular. En el resto de las muestras, los linfocitos T CD3+ fueron escasos con una distribución perivascular.

#### 4.3.2.2. Expresión génica

Con el análisis, mediante RT-PCR en tiempo real (ver en SUJETOS Y MÉTODOS, sección 3.2.6.2), de la expresión relativa de algunos genes involucrados en el control del ciclo celular (*RBI* y *TP53*), no se encontraron diferencias entre el TA peri-lipoma de sujetos lipodistróficos y sujetos controles. En los lipomas, el dato más destacado fue la menor expresión de *TP53* con respecto al TA peri-lipoma, tanto en controles como en sujetos lipodistróficos (Tabla 4.45).

En cuanto al análisis de marcadores de la función mitocondrial se observó que: la expresión del ARNm de *MT-CO2*, un transcrito codificado por el ADN mitocondrial, estaba significativamente reducido en TA peri-lipoma de pacientes FPLD2 respecto a los controles, con una reducción menos notable de la expresión en lipomas lipodistróficos (Tabla 4.45). Esta reducción no podría ser atribuida a cambios en las cantidades relativas de ADN mitocondrial, las cuales estaban inalteradas o incluso incrementadas en las muestras lipodistróficas. *SIRT3*, gen que codifica para una proteína mitocondrial implicada en la regulación del catabolismo lipídico mitocondrial [439], estaba claramente reducida sólo en lipomas de pacientes FPLD2 (Tabla 4.44).

Con el análisis de la expresión de marcadores de inflamación e infiltración de leucocitos no se observó una clara tendencia en la expresión de los transcritos *CD3D* y *CD68* (Tabla 4.45) que corroborara nuestros hallazgos en el estudio inmunohistoquímico. La expresión de *CD3D* y *CD68* podría estar midiendo en una pequeña parte de ARN, correspondiente a las células *CD3+* y *CD68+*, del total de ARN a partir de las muestras de tejido adiposo, lo cual confiere una baja sensibilidad a este ensayo respecto a las observaciones inmunohistoquímicas. Sin embargo, se observó que la expresión de *IL8* y *TNF* era superior en muestras lipoatróficas peri-lipoma con respecto a los controles. Además, observamos una tendencia hacia una menor expresión de estos genes en lipomas lipodistróficos (Tabla 4.45).

La expresión de genes relacionados directamente con la diferenciación de adipocitos se encontró significativamente reducida en TA peri-lipoma lipoatrófico de pacientes con FPLD2. Así, la expresión relativa de los genes *CEBPA*, *CEBPB*, *PPARG*, *LPL* y *SLC2A4* fue un 45-80% menor en estos pacientes. Sin embargo, estas diferencias no se encontraron en las muestras de pacientes lipodistróficas procedentes de áreas lipohipertróficas (Tabla 4.45).

La expresión de varios adipogenes y marcadores de adipocitos maduro se encontró estaba aumentada en los lipomas. Así, la expresión de *SREBF1*, *CEBPA* y *SLC2A4* se halló que estaba aumentada en los lipomas de sujetos controles respecto al TA peri-lipoma. Sin embargo, no se observaron cambios en el resto de los adipogenes estudiados (*PPARG*, *CEBPB*, *LPL*, *LEP*, *FABP4*) (Tabla 4.45). De modo general, la expresión de los adipogenes analizados estaba reducida en los lipomas lipodistróficos procedentes de áreas lipoatróficas, sin embargo, esta reducción en la expresión no se observó en lipomas lipodistróficos procedentes de áreas lipohipertróficas.

Por último, la expresión de los genes *UCP1* y *DLK1* (Pref1) fue indetectable en todas las muestras estudiadas.

Tabla 4.45: Expresión génica relativa, referida al gen *POLR2AI*, en TA de peri-lipoma y lipoma de sujetos FPLD2 y controles, áreas lipoatróficas (A) y lipohipertróficas (B).

A)

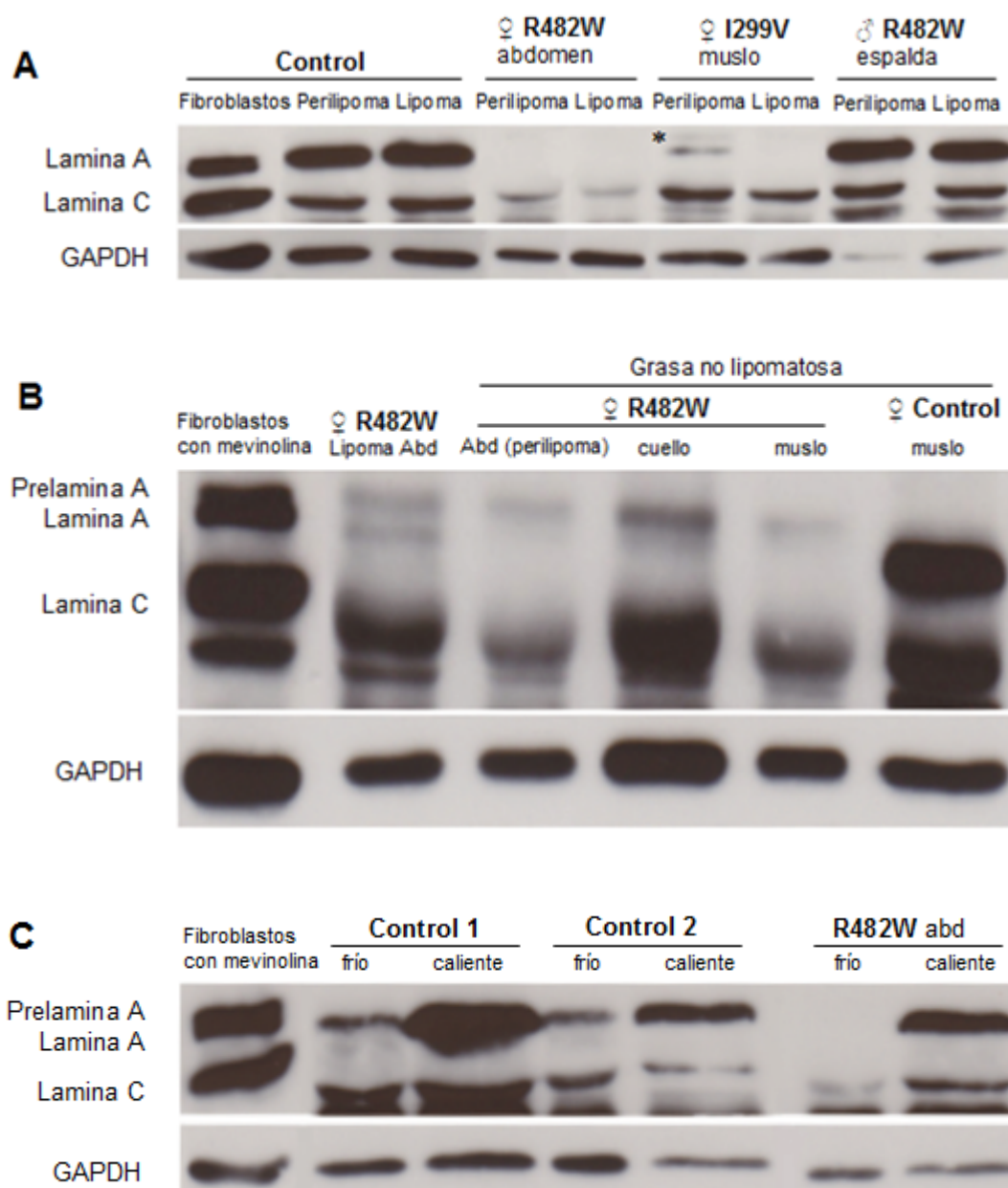
Tejido adiposo de áreas lipoatróficas								
Gen	PERI-LIPOMA				LIPOMA			
	Abdomen		Muslo		Abdomen		Muslo	
	Control	R482W	Control	I299V	Control	R482W	Control	I299V
RB1	1.04 ± 0.21	1.34	1.01 ± 0.11	1.44	0.74 ± 0.05	1.33	0.87 ± 0.04	0.99
TP53	1.01 ± 0.24	1.20	1.00 ± 0.90	1.23	0.56 ± 0.22	1.03	0.64 ± 0.04	1.01
LMNA	1.02 ± 0.37	1.34	1.04 ± 0.33	1.27	0.66 ± 0.09	1.05	1.02 ± 0.50	1.03
SREBF1	1.05 ± 0.37	0.81	1.15 ± 0.66	0.35	3.52 ± 0.19	1.24	1.94 ± 0.21	0.93
PPARG	1.02 ± 0.21	0.45	1.02 ± 0.18	0.32	0.86 ± 0.33	0.38	1.03 ± 0.13	0.10
CEBPA	1.02 ± 0.22	0.31	1.04 ± 0.30	0.36	1.28 ± 0.52	0.58	1.95 ± 0.69	0.14
CEBPB	1.04 ± 0.31	0.18	1.08 ± 0.45	0.47	0.93 ± 0.04	0.71	1.22 ± 0.70	0.45
LPL	1.03 ± 0.25	0.38	1.07 ± 0.27	0.27	0.50 ± 0.33	0.38	0.98 ± 0.28	0.10
SLC2A4	1.03 ± 0.29	0.45	1.04 ± 0.31	0.23	2.44 ± 1.07	1.00	2.74 ± 0.81	0.26
LEP	1.46 ± 1.23	0.87	1.14 ± 0.47	1.17	0.95 ± 0.80	2.66	2.17 ± 1.31	0.20
FABP4	1.04 ± 0.33	0.53	1.01 ± 0.16	0.43	0.80 ± 0.01	0.78	1.28 ± 0.55	0.13
CD3D	1.08 ± 0.06	0.40	0.76 ± 0.19	1.14	0.97 ± 0.11	0.50	1.06 ± 0.52	1.38
CD68	1.04 ± 0.13	0.68	0.90 ± 0.06	0.74	1.14 ± 0.01	0.63	1.04 ± 0.2	3.93
IL8	1.07 ± 0.87	1.57	0.98 ± 0.06	2.30	1.21 ± 0.91	0.79	2.54 ± 2.04	0.11
TNF	1.36 ± 0.32	1.84	0.70 ± 0.24	3.94	0.91 ± 0.25	0.35	0.76 ± 0.53	0.92
MT-CO2	1.11 ± 0.31	0.61	1.51 ± 0.14	0.63	0.95 ± 0.35	0.88	1.03 ± 0.50	0.38
COX4I1	1.08 ± 0.05	0.77	0.62 ± 0.19	1.06	0.51 ± 0.22	1.02	0.94 ± 0.32	0.73
SIRT3	1.05 ± 0.09	0.81	1.16 ± 0.66	1.09	1.48 ± 0.12	0.71	0.92 ± 0.17	0.32
mtDNA	1.04 ± 0.04	0.31	0.65 ± 0.07	0.98	1.14 ± 0.05	1.43	1.20 ± 0.57	1.20

B)

Tejido adiposo de áreas lipohipertróficas								
Gen	PERI-LIPOMA				LIPOMA			
	Espalda		Abdomen		Espalda		Abdomen	
	Control	R482W	Control	I299V	Control	R482W	Control	I299V
RB1	1.03 ± 0.20	1.03	1.03 ± 0.28	0.98	1.04 ± 0.41	1.02	0.74 ± 0.05	1.16
TP53	1.02 ± 0.19	0.82	1.02 ± 0.24	1.32	0.56 ± 0.60	0.59	0.58 ± 0.22	0.52
LMNA	1.10 ± 0.03	1.10	1.05 ± 0.37	1.81	0.72 ± 0.25	0.49	0.66 ± 0.09	0.57
SREBF1	1.02 ± 0.21	1.22	1.05 ± 0.37	3.09	1.14 ± 0.49	1.23	3.52 ± 0.19	2.29
PPARG	1.07 ± 0.38	0.71	1.02 ± 0.21	0.89	0.81 ± 0.43	0.73	0.86 ± 0.33	0.76
CEBPA	1.09 ± 0.42	0.82	1.02 ± 0.22	1.08	1.46 ± 0.76	1.48	1.28 ± 0.52	1.43
CEBPB	1.35 ± 1.13	0.67	1.04 ± 0.31	0.74	0.88 ± 0.38	0.81	0.93 ± 0.04	0.83
LPL	1.09 ± 0.40	0.66	1.03 ± 0.25	0.83	0.80 ± 0.40	0.84	0.50 ± 0.33	0.42
SLC2A4	1.20 ± 0.51	0.51	1.03 ± 0.29	0.66	2.27 ± 1.29	1.25	2.44 ± 1.07	0.89
LEP	1.09 ± 0.40	0.66	1.03 ± 0.25	0.83	0.80 ± 0.40	0.84	0.50 ± 0.33	0.42
FABP4	1.05 ± 0.37	1.42	1.04 ± 0.33	0.62	1.42 ± 0.39	1.60	0.80 ± 0.01	0.97
CD3D	1.55 ± 0.69	1.67	0.97 ± 0.11	0.67	0.90 ± 0.16	0.91	0.62 ± 0.07	0.45
CD68	1.19 ± 0.47	0.69	1.06 ± 0.11	0.51	0.88 ± 0.28	1.30	1.00 ± 0.40	0.71
IL8	1.01 ± 0.33	1.04	0.50 ± 0.03	0.41	1.46 ± 1.68	0.09	0.49 ± 0.10	0.17
TNF	0.88 ± 0.56	0.12	0.56 ± 0.47	0.69	1.22 ± 1.17	0.44	0.81 ± 0.17	0.62
MT-CO2	0.97 ± 0.26	0.24	0.92 ± 0.11	0.58	1.34 ± 0.91	1.47	0.75 ± 0.12	0.71
COX4I1	0.99 ± 0.93	0.52	0.98 ± 0.04	1.09	0.95 ± 0.29	1.57	0.42 ± 0.02	0.29
SIRT3	1.05 ± 0.24	0.95	0.91 ± 0.01	1.59	1.24 ± 0.56	0.59	1.17 ± 0.31	0.81
mtDNA	0.43 ± 0.05	1.55	0.91 ± 0.12	1.30	1.14 ± 0.60	1.32	1.36 ± 0.86	1.23

## 4.3.2.3. Estudios de expresión de proteínas

El análisis de expresión de las proteínas Lamina A y C, prelamina A, p53, p21, C/EBPalfa, C/EBPbeta, PPARgamma, pRb y pRb-fosforilado mediante Western Blot, en las 8 muestras de tejido adiposo de pacientes lipodistróficos (4 lipomas y la grasa adyacente) y en 8 muestras de sujetos controles (4 lipomas y la grasa adyacente), con el correspondiente análisis densitométrico de las bandas relativo a los valores del control de carga (GADPH o beta-actina), se muestra en las figuras siguientes:



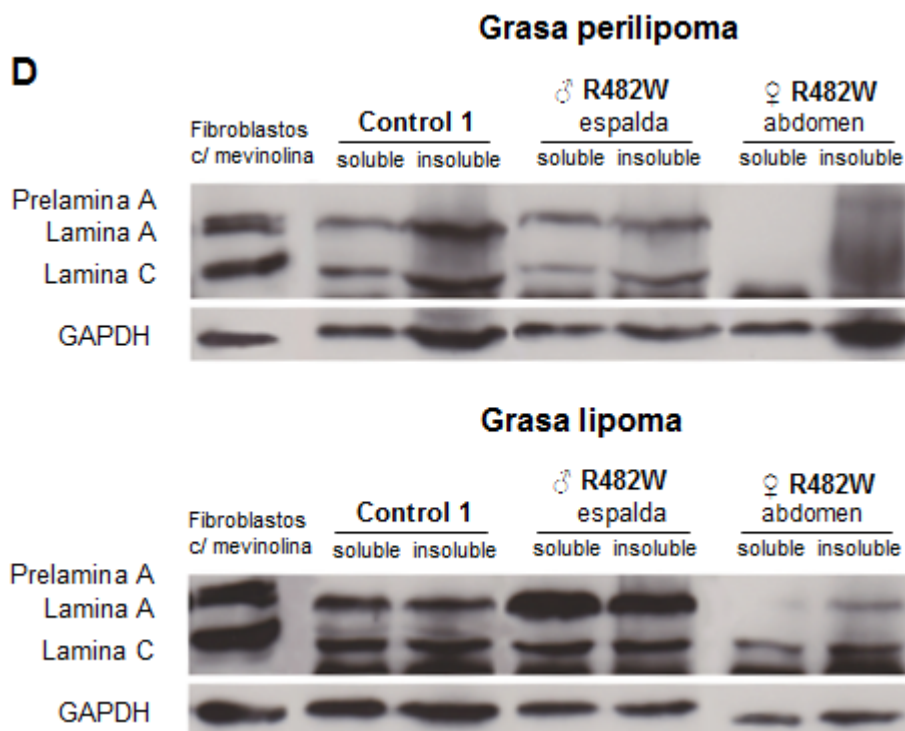
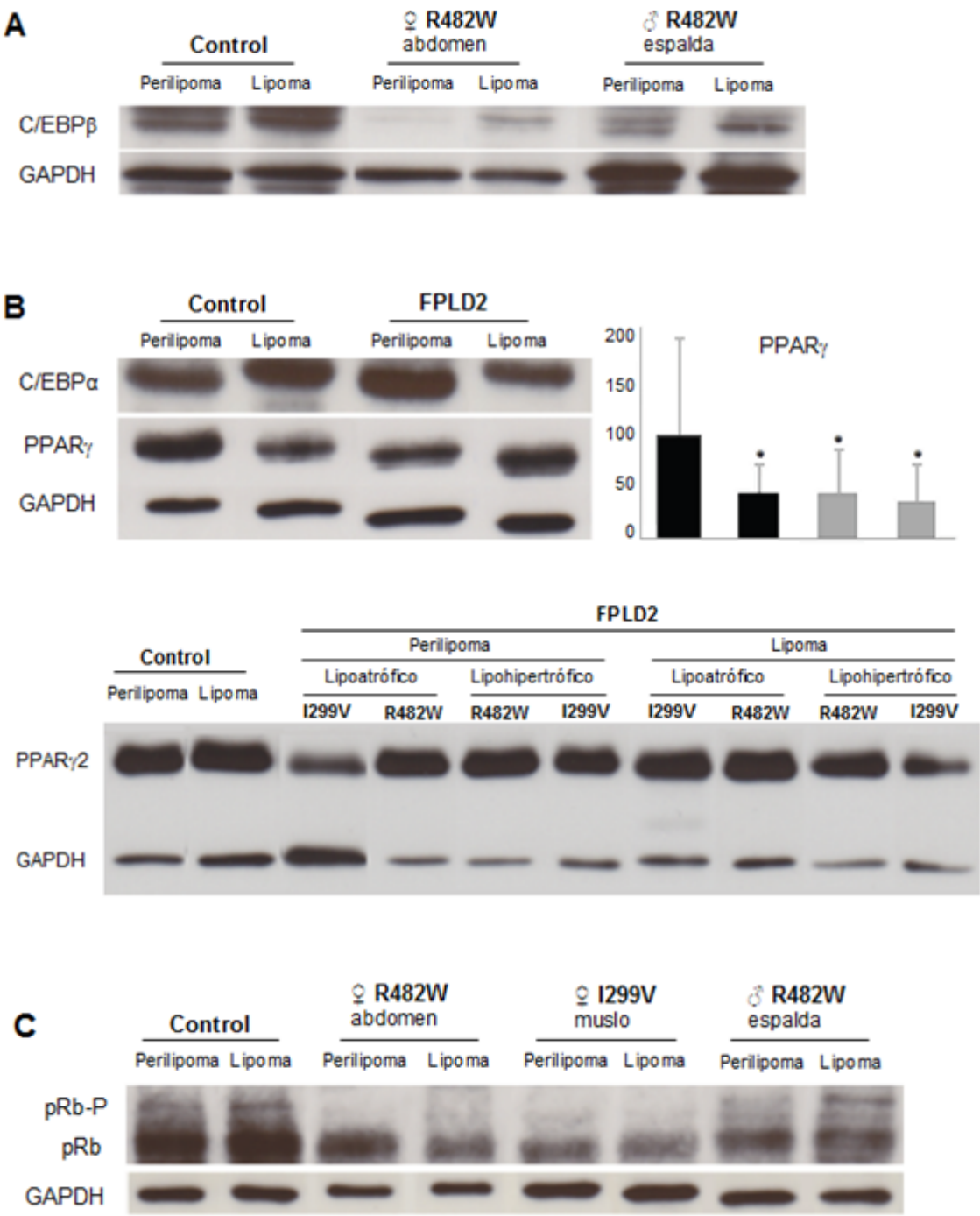


Figura 4.56: Análisis por Western blot de prelamina A y lamina A/C en tejido adiposo (TA). A: Detección de lamina A y C en muestras de TA de peri-lipoma y lipoma de un sujeto control representativo y dos pacientes lipodistróficos (portadores de las mutaciones R482W ó I299V en *LMNA*). \*, banda de prelamina A. B: Detección de prelamina A, lamina A y C en TA de lipoma y peri-lipoma de diferentes localizaciones anatómicas de un mismo paciente FPLD2 (R482W). C: Detección de lamina A y C en grasa no lipomatosa de controles representativos y una mujer con FPLD2 (R482W), a partir de dos protocolos de extracción de proteínas totales con diferentes temperaturas y condiciones reductoras, “frío” o “caliente”, ver detalles en sección 3.2.2.3 de Sujetos y Métodos. D: Detección de lamina A y C en las fracciones soluble e insoluble del TA de peri-lipoma y lipoma, obtenidas de un sujeto control representativo, un hombre con FPLD2 (R482W, región lipohipertrófica, espalda) y una mujer con FPLD2 (R482W, región lipoatrófica, abdomen). Se utilizaron fibroblastos de un sujeto control, previamente tratados con mevinolina durante 18 h, como control de peso molecular para la prelamina A. El análisis de la proteína GAPDH nos sirvió como control de carga de las proteínas totales en el gel.





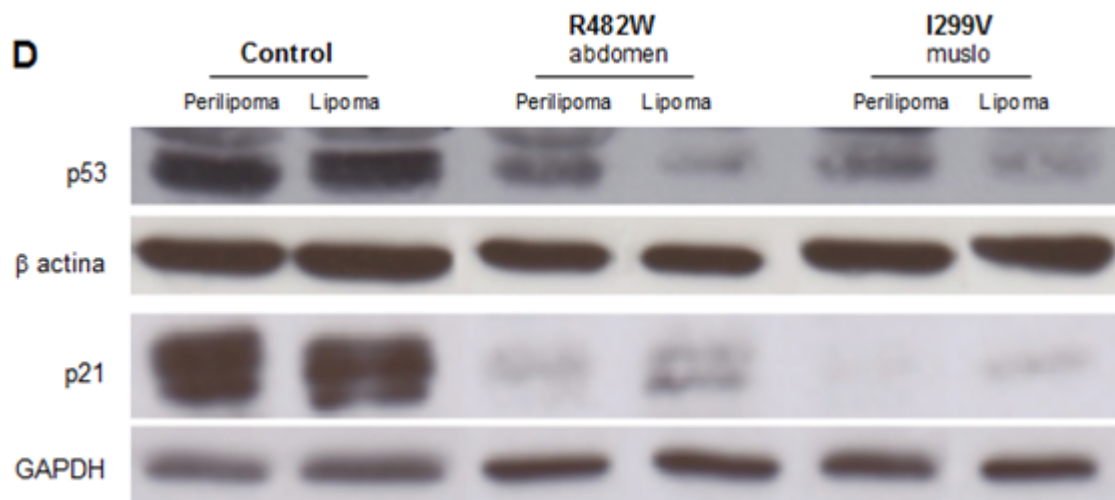


Figura 4.57: Análisis por Western blot de diferentes proteínas relacionadas con adipogénesis y ciclo celular, en muestras de tejido adiposo (TA) de peri-lipoma y lipoma de un sujeto control representativo y pacientes lipodistróficos. A: Detección de C/EBP $\beta$ . B: Detección de C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  y PPAR $\gamma$ 2. Análisis densitométrico de las bandas de PPAR $\gamma$  en TA de sujetos controles (barras en negro) y sujetos FPLD2 (barras en gris), a partir de sujetos controles n=5 y pacientes FPLD2 n=4. Los datos se expresan como el valor medio  $\pm$  SD. \*p < 0.05. C: Detección de pRb y pRb fosforilado (pRb-P). D: Detección de p53 y p21. El análisis de la proteína GAPDH nos sirvió como control de carga de las proteínas totales en el gel.

#### **4.4. ESTUDIO DEL PAPEL DE LAS HORMONAS SEXUALES EN LA ADIPOGÉNESIS Y SU RELACIÓN CON LA ACUMULACIÓN DE PRELAMINA A FARNESILADA.**

Se ha descrito que la acumulación de prelamina A farnesilada podría ser un posible mecanismo responsable de la pérdida de grasa en la lipodistrofia parcial familiar debido a mutaciones en *LMNA* (FPLD2). Dado que en esta enfermedad monogénica rara la pérdida de grasa aparece en las mujeres después de la pubertad, afectando a áreas anatómicas dependientes de hormonas sexuales, nuestra hipótesis es que en presencia de estrógenos la prelamina A farnesilada ejerce un efecto tóxico sobre la adipogénesis. Para verificar esta hipótesis se evaluó *in vitro* el efecto del 17 beta-estradiol (a concentración fisiológica) sobre la diferenciación de preadipocitos murinos 3T3-L1 sometidos a acumulación farmacológica de prelamina A farnesilada.

##### **4.4.1. ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LAS CÉLULAS TRATADAS**

El tratamiento con el coctel clásico de diferenciación de adipocitos más pioglitazona indujo la diferenciación de los preadipocitos 3T3-L1 a adipocitos, se observó un notable cambio morfológico de las células y la acumulación de gotas de lípidos, visualizada por tinción con rojo oleoso (Figura 4.58 A).

El tratamiento con 17 beta-estradiol no produjo efectos morfológicos evidentes en las células diferenciadas (Figura 4.58 B).

El tratamiento con inhibidores de la maduración de prelamina A tampoco provocó cambios apreciables mediante microscopía óptica en el proceso de maduración de los adipocitos (Figura 4.58 C).

La suplementación del coctel de diferenciación con pioglitazona podría estar enmascarando los posibles efectos de estos tratamientos, sobre todo de los inhibidores FTI y AFCMe.

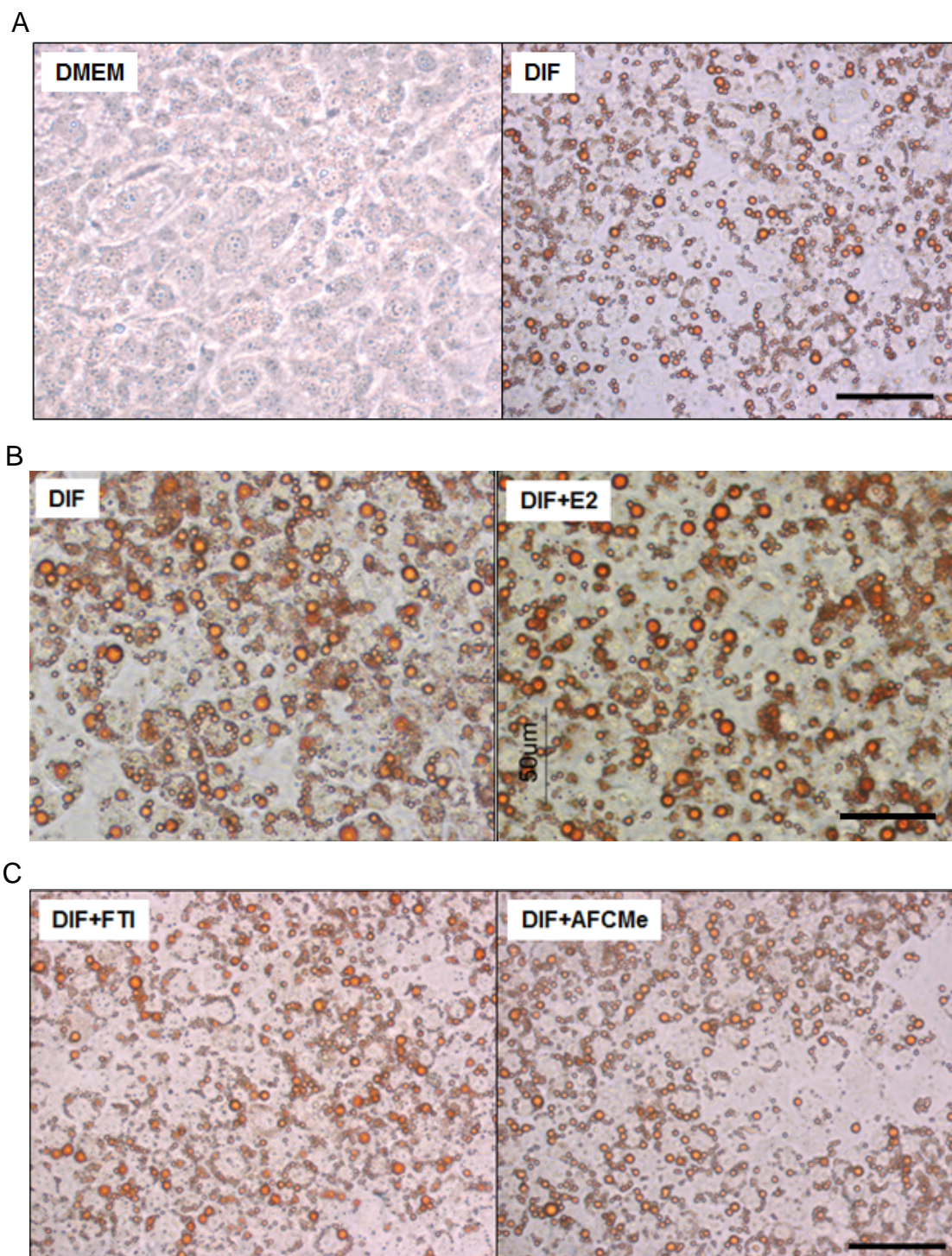
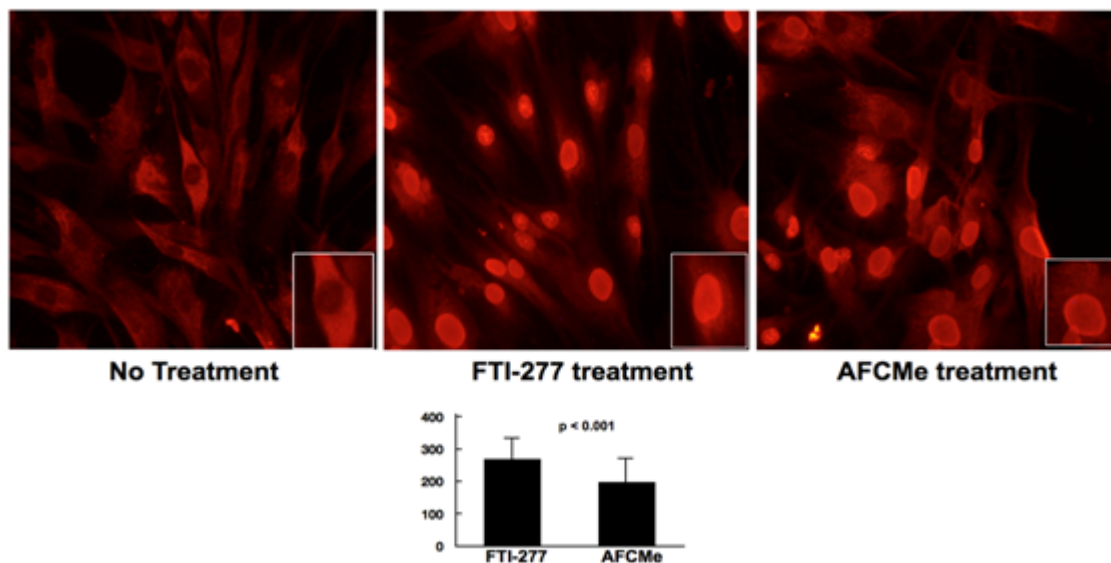


Figura 4.58: Diferenciación adipogénica de los preadipocitos 3T3-L1. A: Las células 3T3-L1 fueron inducidas a la diferenciación durante 6 días como se describe en SUJETOS Y MÉTODOS (sección 2.6.3.3) con el medio “DIF” (coctel de diferenciación estándar más pioglitazona). B: Las células en medio DIF fueron tratadas con estradiol (E2)  $10^{-9}$ M, durante los 6 días de diferenciación. C: Las células en medio DIF fueron tratadas con FTI 20  $\mu$ M (las primeras 24 h) y 2.5  $\mu$ M (día 2-6 de diferenciación) o AFCMe 10  $\mu$ M (las primeras 24 h) y 1  $\mu$ M (día 2-6 de diferenciación). Tinción con rojo oleoso al día 6 de diferenciación y observación al microscopio (Nikon eclipse TE300) (40 x). Barra, 50  $\mu$ m.

#### 4.4.2. EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA

Para verificar la acumulación de prelamina A farnesilada en las células tratadas con AFCMe, dada la no existencia en el mercado de anticuerpos específicos para detectar esta proteína en células de ratón, se evaluó su acumulación en preadipocitos humanos primarios por inmunofluorescencia (ver SUJETOS Y MÉTODOS sección 3.2.4.4). Se observó que el tratamiento con inhibidores de la maduración de la prelamina A provocó la migración y acumulación nuclear de prelamina A farnesilada (por tratamiento con AFCMe) y de la prelamina A total no farnesilada (por tratamiento con FTI) (Figura 4.59).

A

**Total non-farnesylated Prelamin A**

B

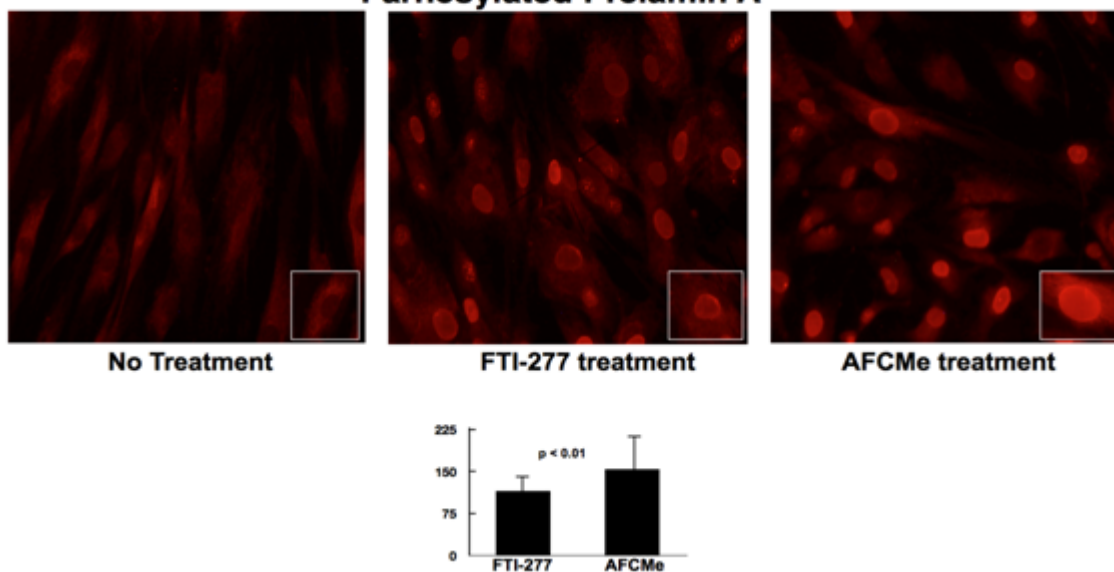
**Farnesylated Prelamin A**

Figura 4.59: Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de prelamina A en preadipocitos humanos, cultivo primario a partir de una biopsia de un paciente control, tratados con FTI 20  $\mu$ M ó AFCMe 10  $\mu$ M. La tinción del núcleo fue contrastada con DAPI. Microscopio olympus IX70 (objetivo 20x). Análisis colorimétrico de la tinción con los anticuerpos anti-prelamina A. A: Prelamina cadena completa (anticuerpo ANT0045, Diatheva). B: Prelamina farnesilada (anticuerpo anti-prelamina A carboximetil-farnesilada (ANT0046, Diatheva).

Con la diferenciación de los adipocitos murinos 3T3-L1 se observó una menor expresión de lamina A/C, determinada tanto mediante western blot como mediante RT-PCR en tiempo real (Figuras 4.60 y 4.61). No se observaron diferencias significativas en la expresión de las proteínas lamina A/C con los diferentes tratamientos, detectada por western blot (Figuras



4.60). Sin embargo, la expresión del ARNm de lamina A tuvo un aumento estadísticamente significativo en los adipocitos tratadas con 17 beta-estradiol.

Además, en las células tratadas con FTI se observó, como era de esperar, una banda superior a la banda de lamina A (Figura 4.60, señalada con un asterisco) que por su peso molecular se corresponde con la prelamina A. Sin embargo, no se detectó banda de prelamina A en las células tratadas con AFCMe.

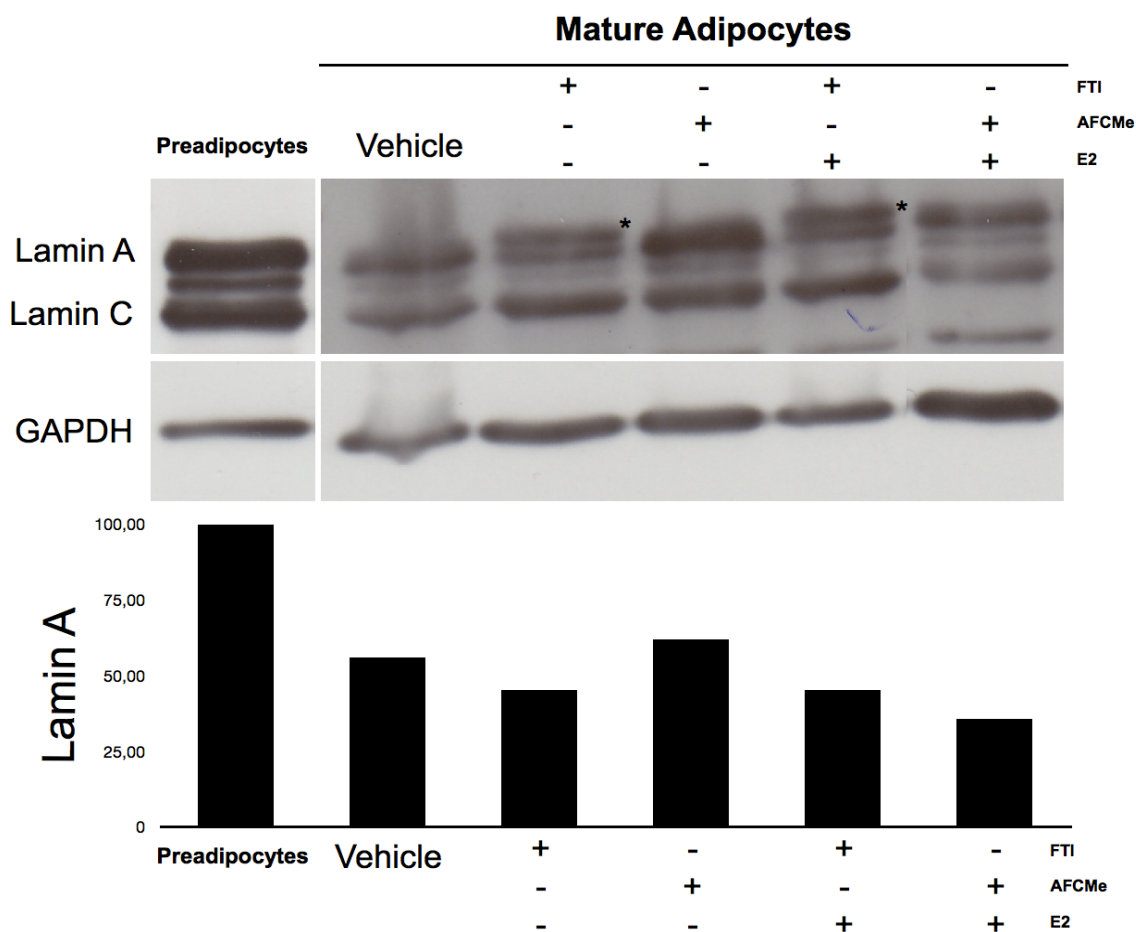


Figura 4.60: Efecto del tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol e inhibidores de la maduración de la lamina A, sobre la expresión de lamina A/C, durante la diferenciación de células 3T3-L1. A: Detección por Western blot de prelamina A y C en células tratadas con FTI o AFCMe y estradiol 10<sup>-9</sup> M (E2). Análisis densitométrico de las bandas de lamina A. El análisis de la proteína GAPDH nos sirvió como control de carga de las proteínas totales en el gel. \*, Prelamina A.

Como era de esperar, la inducción de la diferenciación de adipocitos incrementó notablemente la expresión de todos los genes estudiados relacionados con la adipogénesis (tanto en la expresión de ARNm como en la de proteínas) (ver Figura 4.61 y Figura 4.62).

El tratamiento con estradiol aumentó la expresión de los principales adipogenes (*C/EBPb*, *C/EBPα*, *Pparg*) y marcadores de adipocito maduro (*Lpl* y *Glut4*) (Figura 4.61). Estos resultados se vieron parcialmente corroborados en el análisis de expresión de las correspondientes proteínas (ver Figura 4.62).

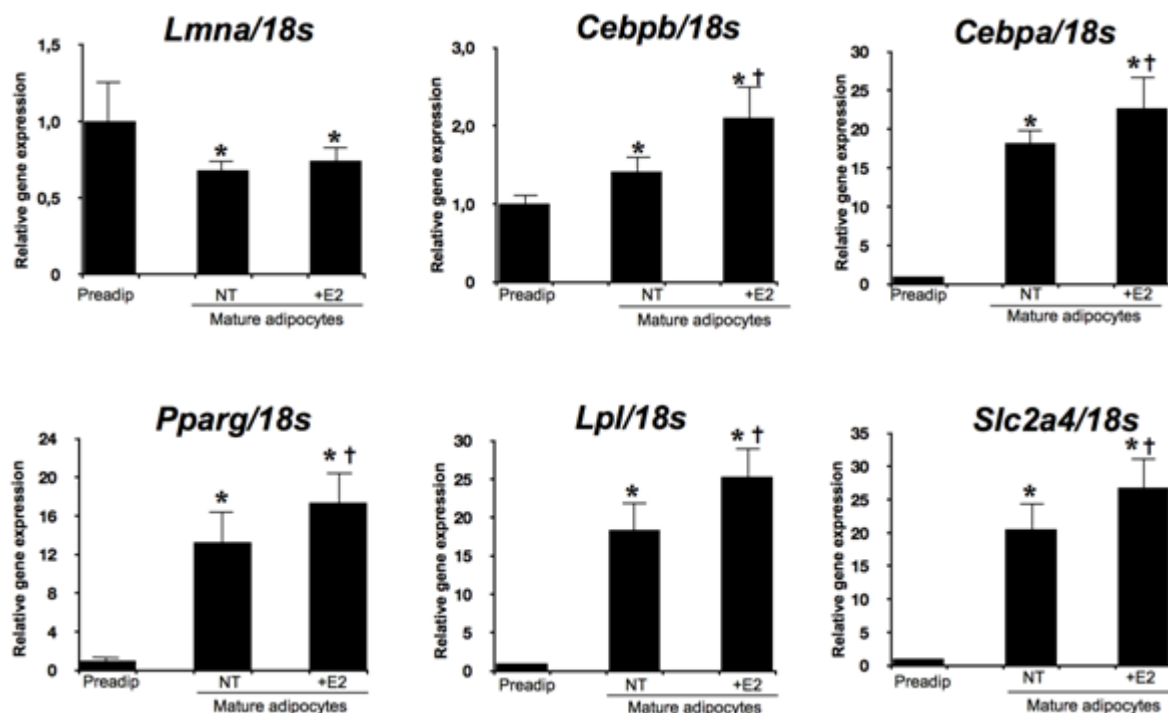
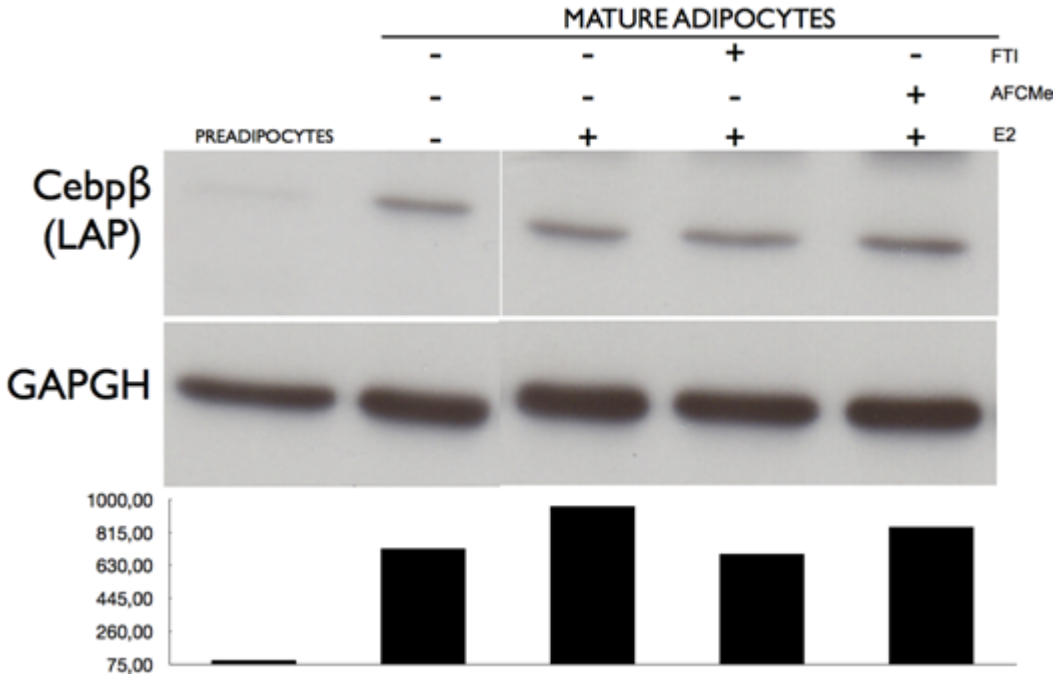
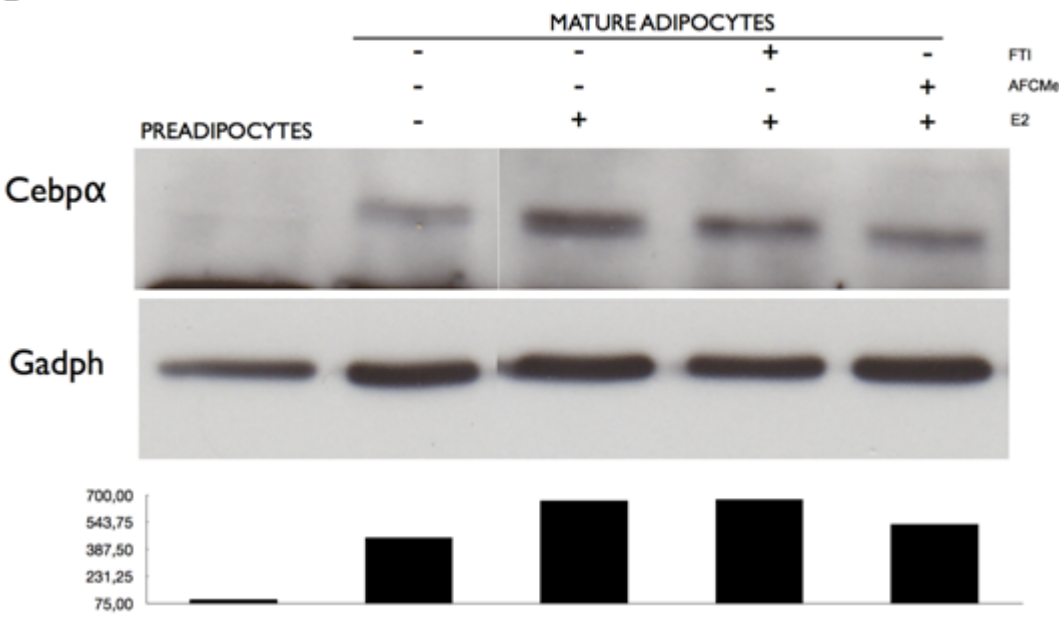


Figura 4.61: Efecto del tratamiento con 17 $\beta$ -estradiol sobre *Lmna* y los adipogenes en las células 3T3-L1 durante la diferenciación de adipocitos. Expresión génica relativa de *Lmna*, *Cebpb*, *Cebpa*, *Pparg*, *Lpl* y *Slc2a4* al día 6 de diferenciación, cuantificada por RT-PCR en tiempo real y normalizada con la expresión del gen *Rn18s*. Los datos representan las medias  $\pm$  SD. Preadip, preadipocitos sin medio de diferenciación; NT, no tratados; E2, 17 $\beta$ -estradiol  $10^{-9}$  M. \*,  $p < 0.05$  vs. preadipocitos; †,  $p < 0.05$  vs. adipocitos maduros no tratados.

A



B





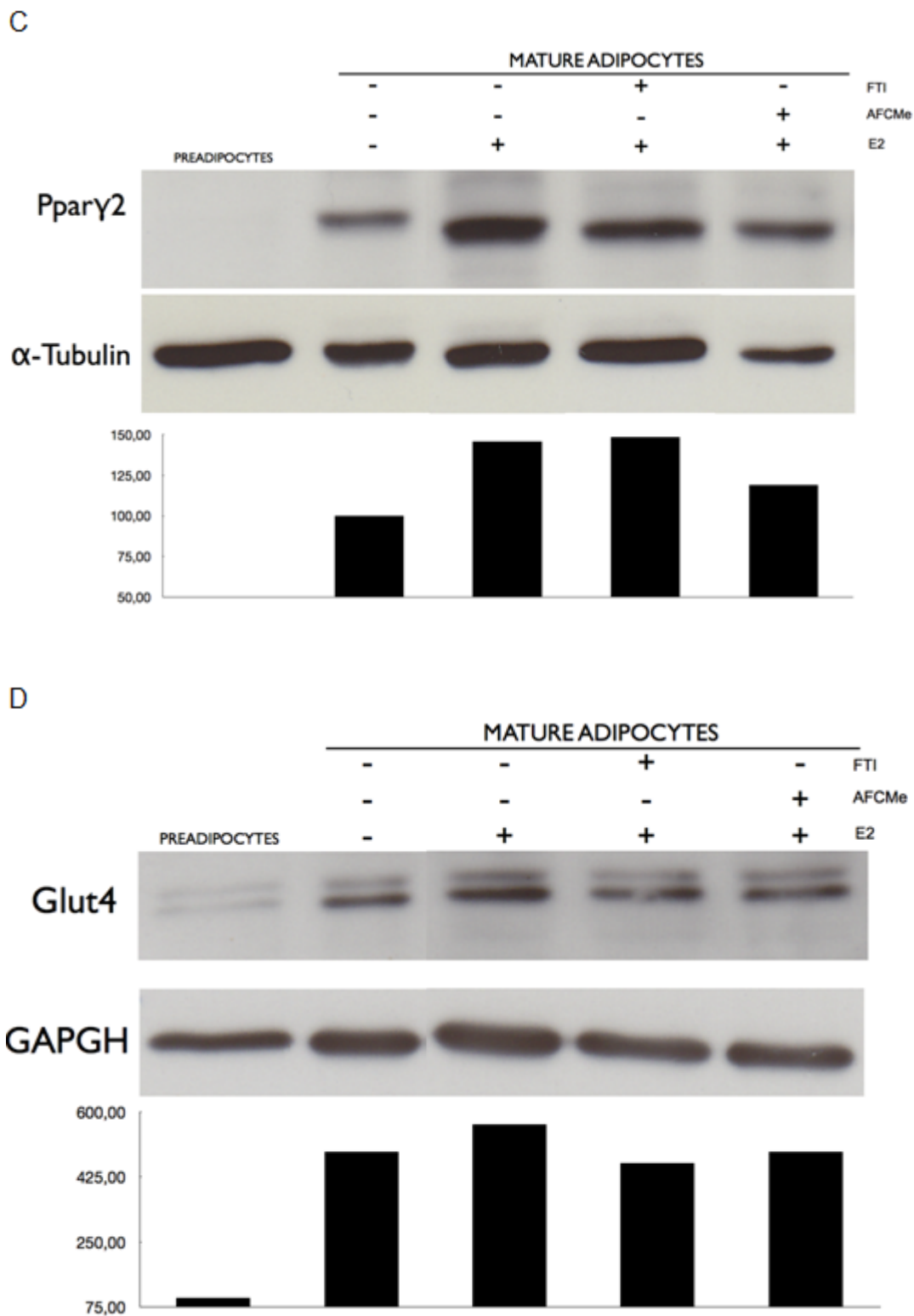


Figura 4.62: Efecto del tratamiento con  $17\beta$ -estradiol e inhibidores de la maduración de la lamina A, sobre la expresión de marcadores adipogénicos, durante la diferenciación de células 3T3-L1. Detección por Western blot de estas proteínas en las células tratadas con FTI o AFCMe y estradiol (E2) (ver SUJETOS Y MÉTODOS sección 2.4). Análisis densitométrico de las bandas obtenidas. La detección de la proteína GAPDH o  $\alpha$ -Tubulina se utilizó como control de carga de las proteínas totales en el gel. A: C/EBP $\beta$ . B: C/EBP $\alpha$ . C: PPAR $\gamma$ 2. D: GLUT4.

El tratamiento con FTI redujo la expresión de los adipogenes estudiados (Tabla 4.46), evaluada por PCR en tiempo real. Este efecto del tratamiento con FTI sólo fue apreciable en la expresión de la proteína C/EBP $\alpha$ , analizada por western blot (Figura 4.62).

Tabla 4.46: Efecto sobre la expresión de *LMNA* y los principales adipogenes en las células tratadas con los inhibidores de la maduración de prelamina A.

Gen	Preadipocitos	Adipocitos	Adipocitos +FTI	Adipocitos +AFCMe
<i>PPARG</i>	1.0 $\pm$ 0.14	10.63 $\pm$ 0.3*	4.05 $\pm$ 0.2*†	9.7 $\pm$ 0.2*
<i>LMNA</i>	1.0 $\pm$ 0.14	0.42 $\pm$ 0.03*	0.33 $\pm$ 0.02*	0.48 $\pm$ 0.06*
<i>LPL</i>	1.0 $\pm$ 0.12	42.04 $\pm$ 0.03*	14.55 $\pm$ 0.55*†	33.4 $\pm$ 5.59*
<i>CEBPA</i>	1.0 $\pm$ 0.07	35.3 $\pm$ 4.7*	12.4 $\pm$ 0.99*†	36.3 $\pm$ 7.2*
<i>CEBPB</i>	1.0 $\pm$ 0.17	1.54 $\pm$ 0.18*	0.69 $\pm$ 0.05*†	1.89 $\pm$ 0.36*
<i>GLUT4</i>	1.0 $\pm$ 0.17	52.8 $\pm$ 12.8*	20.0 $\pm$ 1.49*†	53.3 $\pm$ 10.3*

\*, p<0.05 vs. preadipocitos; †, p<0.05 vs. adipocitos

Con el tratamiento combinado del 17beta-estradiol y los inhibidores de la maduración de prelamina A, el efecto más notable fue la drástica disminución de la expresión de los principales adipogenes y marcadores de maduración de los adipocitos cuando las células fueron tratadas con AFCMe (Figura 4.63). Este efecto inhibitorio del tratamiento combinado AFCMe-estradiol se corroboró por western blot en la expresión de las proteínas C/EBP $\beta$  y PPAR $\gamma$  (Figura 4.62).

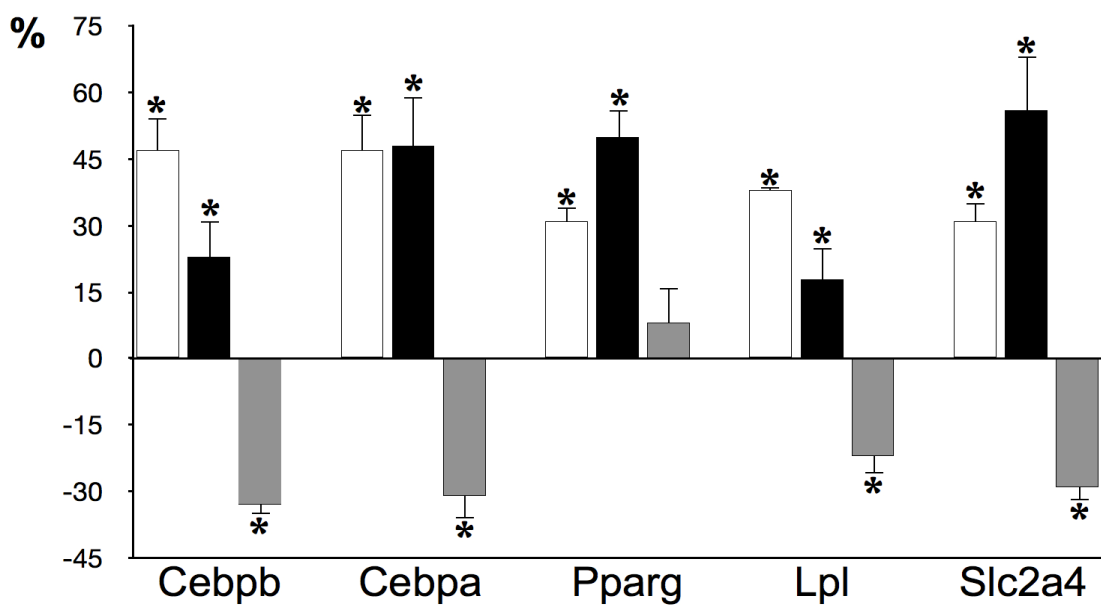


Figura 4.63: Efecto del tratamiento con  $17\beta$ -estradiol e inhibidores de la maduración de la lamina A, sobre la expresión relativa de los genes estudiados expresado como el incremento/decremento porcentual con respecto a las células diferenciadas sin tratamiento. Barras blancas: vehículo, Barras negras: FTI-277, Barras grises: AFCMe.  $n=4$ , \*,  $p < 0.01$  vs. adipocitos diferenciados no tratados con hormonas sexuales.; Dif., medio de diferenciación de adipocitos sin inhibidores.

#### **4.5. ESTUDIO *IN VITRO* DE LA ADIPOGÉNESIS EN FIBROBLASTOS PRIMARIOS DE UN PACIENTE CON LIPODISTROFIA CONGÉNITA GENERALIZADA TIPO 2 Y PAPEL DE LAS GLITAZONAS.**

Con el objetivo de buscar nuevos datos que ayuden a dilucidar los mecanismos patogénéticos de las lipodistrofias familiares, se analizó, *in vitro*, el comportamiento de fibroblastos primarios de un paciente con lipodistrofia generalizada, debido a una mutación en *BSCL2*, estimulados con medio de diferenciación de adipocitos y tratados con un agonista de PPAR $\gamma$ .

##### **4.5.1. TRATAMIENTO DE FIBROBLASTOS PRIMARIOS EN CULTIVO, CON MEDIO DE DIFERENCIACIÓN, EN PRESENCIA O NO DE PIOGLITAZONA**

Se cultivaron y trataron con medio de diferenciación (con o sin pioglitazona) fibroblastos primarios obtenidos a partir de biopsias de piel del paciente y de un control sano (ver en SUJETOS Y MÉTODOS sección 3.2.6.3).

##### **4.5.2. EXPRESIÓN GÉNICA**

La expresión relativa basal de varios genes (analizada por RT-PCR en tiempo real, ver en SUJETOS Y MÉTODOS, sección 3.2.6.2) relacionados directamente con la adipogénesis (*LPL*, *LEP*, *SLC2A4*) fue notablemente menor en los fibroblastos del paciente lipodistrófico (65-99%) respecto a la expresión de los fibroblastos controles, con la excepción de *PPARG* y *FABP4* (Figura 4.64). La expresión relativa de *PPARG* fue similar en fibroblastos lipodistróficos y controles. Sin embargo, en el análisis por Western blot se observó una menor cantidad de la proteína expresada en fibroblastos lipodistróficos (Figura 4.66). La expresión de *LMNA* fue menor (30 %) en fibroblastos lipodistróficos de abdomen (Figura 4.64).

Después del tratamiento de los fibroblastos controles con medio de diferenciación sin pioglitazona, la respuesta en términos de expresión relativa de genes adipogénicos, fue variable, mostrando un incremento en *PPARG*, *LEP* y *SLC2A4* (Figura 4.64). Sin embargo, el mismo tratamiento en fibroblastos lipodistróficos, provocó un aumento significativo en la expresión relativa de todos los genes adipogénicos estudiados (*PPARG*, *LPL*, *LEP*, *SLC2A4* y *FABP4*) (Figura 3.64). En el caso de *FABP4* el aumento fue incluso mayor que el encontrado

en las células del control. La expresión de *LMNA* fue similar a la encontrada en condiciones basales (Figura 4.64).

Después del tratamiento con medio de diferenciación más pioglitazona, la expresión de genes adipogénicos (*PPARG*, *LPL*, *LEP* y *FABP4*) en células controles aumentó, con la excepción de *SLC2A4*. La respuesta de los fibroblastos lipodistróficos fue muy similar, con un incremento muy significativo en la expresión de estos genes. Así, la expresión de *PPARG* fue mayor en fibroblastos lipodistróficos de abdomen con respecto a la expresión basal. La expresión de *LPL* fue mayor en los fibroblastos BSCL2 de axila, mientras que *LEP*, *SLC2A4* y *FABP4* aumentaron su expresión tanto en las células de abdomen como de axila, con respecto al valor basal. El aumento de la expresión del gen *FABP4* fue particularmente notable. (Figura 4.64). De modo general, la respuesta a este tratamiento fue más significativa en fibroblastos lipodistróficos procedentes de la zona abdominal del paciente que en los fibroblastos procedentes de la axila.

El efecto de la pioglitazona sobre la expresión de PPAR $\gamma$  analizado por Western blot, reveló que el fármaco incrementa la expresión de PPAR $\gamma$  tanto en fibroblastos controles como en lipodistróficos (Figura 4.65).

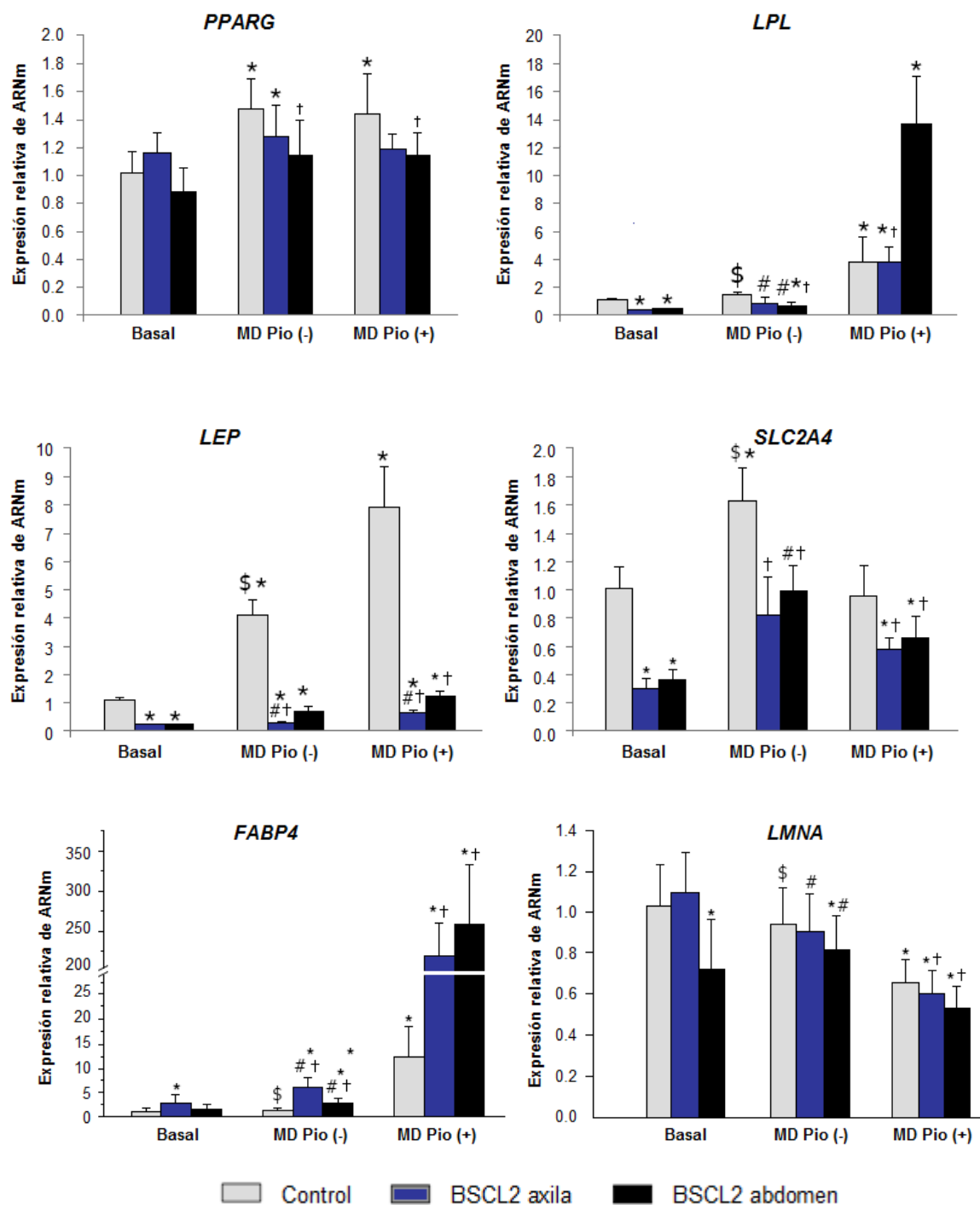


Figura 4.64: Expresión génica relativa de *PPARG*, *LPL*, *LEP*, *SLC2A4*, *FABP4* y *LMNA* en fibroblastos humanos, cuantificada por RT-PCR en tiempo real y normalizada con la expresión del ARNm de *POLR2A*. Los datos representan las medias  $\pm$  SD,  $n=4$ , \*  $p < 0.05$  vs. Control basal; †  $p < 0.05$  vs. BSCL basal; §  $p < 0.05$  vs. Control c/Pio; #  $p < 0.05$  vs. BSCL c/Pio. MD Pio (-), medio de diferenciación sin pioglitazona; MD Pio (+), medio de diferenciación con pioglitazona.

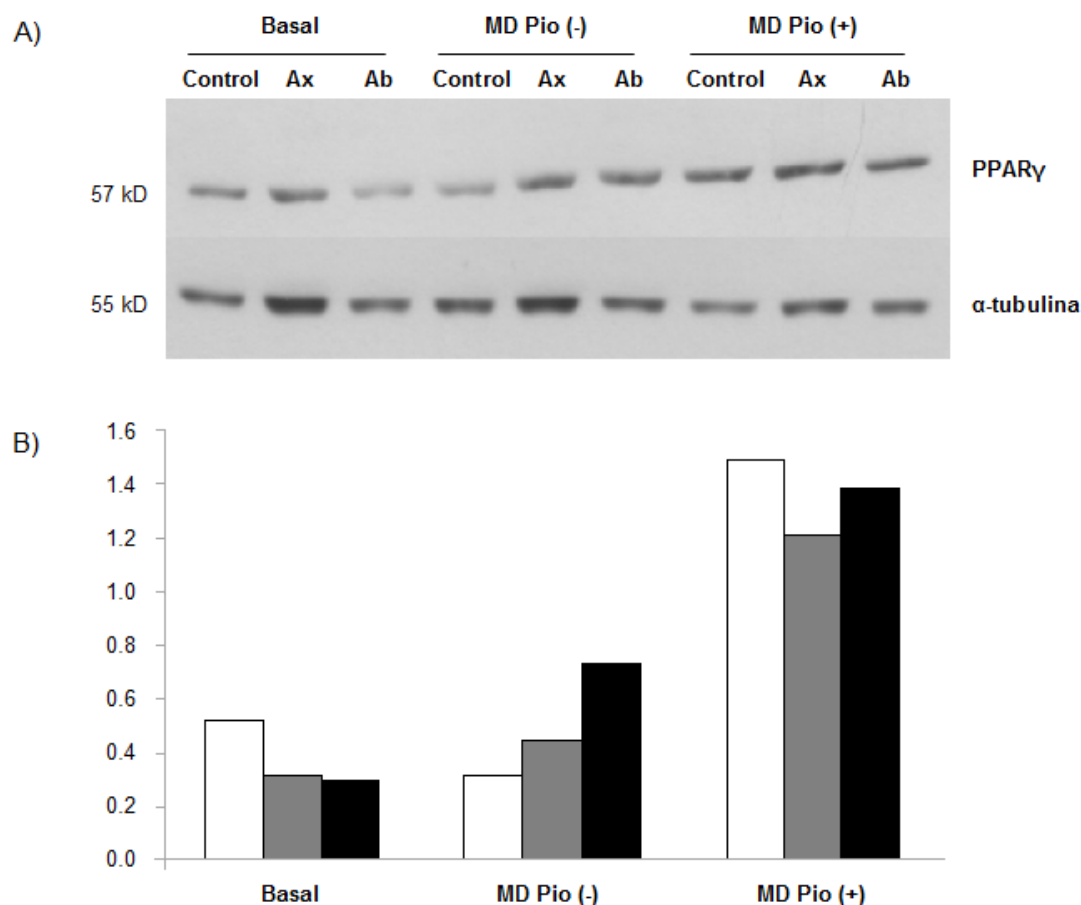


Figura 4.65: Western blot de PPAR $\gamma$  a partir de proteínas totales de fibroblastos: de un control sano (Control) y del paciente BSCL2 de axila (Ax) y abdomen (Ab), tratados con medio de diferenciación (MD: dexametasona, insulina e IBMX) con (Pio +) o sin (Pio -) pioglitazona. A) Revelado de las bandas de PPAR $\gamma$  y  $\alpha$ -tubulina (control de carga). B) El análisis densitométrico de las bandas obtenidas muestra que la expresión de PPAR $\gamma$  fue menor en fibroblastos BSCL2 de axila (barra gris) y de abdomen (barra negra) que en las células del control (barra blanca). La inducción de diferenciación de adipocitos provocó un incremento en la expresión de PPAR $\gamma$ , especialmente en fibroblastos BSCL2.

#### 4.5.3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PRELAMINA A EN FIBROBLASTOS BSCL2 POR ANÁLISIS DE INMUNOFLUORESCENCIA

En el análisis de los fibroblastos primarios BSCL2 por inmunofluorescencia (ver SUJETOS Y MÉTODOS, sección 3.2.5.2.B), se observó un fenómeno no esperado, la acumulación de la prelamina A cadena completa en un 2% de los núcleos de los fibroblastos lipodistróficos y de la forma carboximetil-farnesilada de prelamina A en un 18% de los núcleos de estas células. (Figura 4.66).

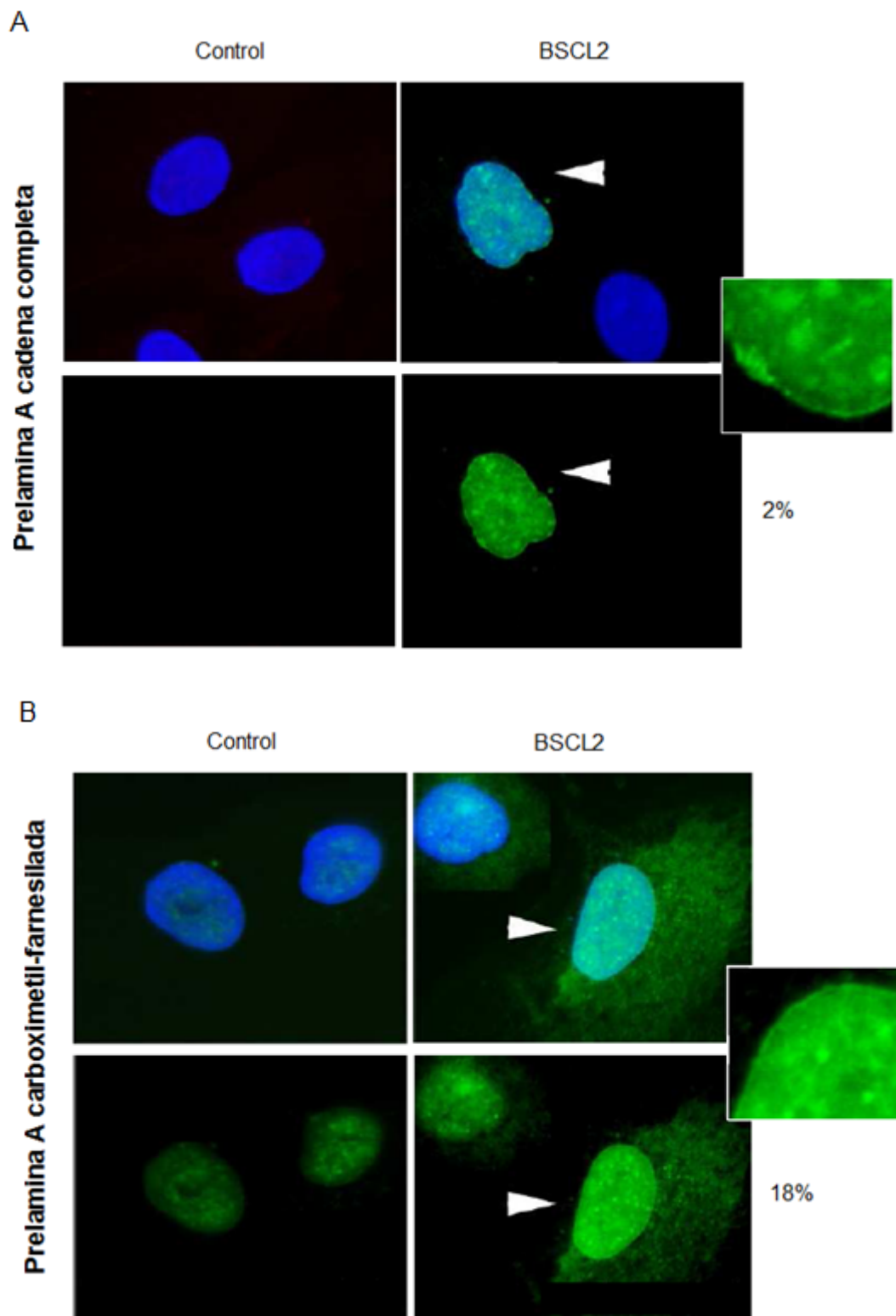


Figura 4.66: Inmunofluorescencia. Tinción de prelamina A cadena completa (A) y prelamina A carboximetil-farnesilada (B) en fibroblastos control y BSCL2 (verde). Se detectó Prelamina A cadena completa y prelamina A carboximetil-farnesilada en 2% y 18%, respectivamente, de los núcleos de los fibroblastos BSCL2. En azul la tinción del ADN con DAPI.



#### 4.5.4. ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA Y PROTEICA DE ZMPSTE24

Para buscar una posible explicación a la acumulación de prelamina A detectada en los fibroblastos del paciente con BSCL2, se analizó la expresión de la metaloproteasa ZMPSTE24 en estas células.

Tanto la expresión relativa del ARNm de *ZMPSTE24*, como de la proteína traducida, evaluadas por RT-PCR en tiempo real y de Western blot, respectivamente, fue similar en fibroblastos lipodistróficos y células controles (Figura 4.67).

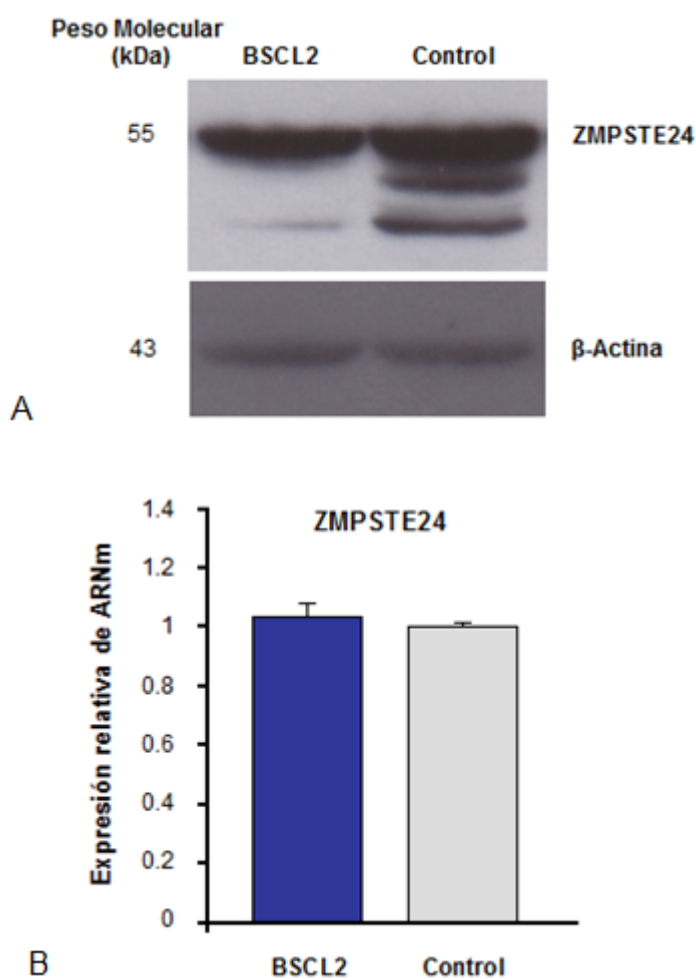


Figura 4.67: Expresión de ZMPSTE24 en fibroblastos del paciente con BSCL2. A: Western blot de los extractos proteicos. La expresión de la proteína ZMPSTE24 fue similar en fibroblastos BSCL2 y fibroblastos controles. B: El análisis por RT-PCR en tiempo real también mostró una expresión del gen *ZMPSTE24* similar en fibroblastos BSCL2 y controles. Los datos fueron normalizados con la expresión del ARNm de *POLR2A*.



## **DISCUSIÓN**



## 5. DISCUSIÓN

En los últimos años se ha avanzado notablemente en el conocimiento de las alteraciones moleculares que se producen en los pacientes con formas genéticas de lipodistrofia. Sin embargo, no están establecidos los mecanismos moleculares por los cuales estos pacientes sufren una pérdida selectiva de la grasa corporal, asociada con severas anormalidades del metabolismo de la glucosa y lipídico, y que pueden originar diabetes con complicaciones cardíacas y hepáticas precoces. Además, existen otros fenotipos lipodistróficos infrecuentes para los cuales no se han identificado las bases genéticas.

El presente trabajo tuvo como objetivo hacer un diagnóstico genético de pacientes con sospecha de lipodistrofia parcial familiar y analizar la relación genotipo-fenotipo. Así mismo, hemos intentado identificar posibles alteraciones moleculares de la adipogénesis en pacientes con lipodistrofias familiares que ayuden a explicar los mecanismos moleculares de estas patologías, abordando el estudio mediante diferentes métodos y con distintos grupos de pacientes.

### **Diagnóstico molecular de FPLD y relación genotipo-fenotipo**

En la población estudiada con sospecha de lipodistrofia, el mayor número de mutaciones se encontró en el gen *LMNA* y, en particular, afectando al codón 482 (mutaciones R482W y R482Q, genotipo clásico de FPLD2). En este gen además encontramos otras dos mutaciones que habían sido anteriormente descritas (T528M y R545H) y dos mutaciones no descritas (I299V y C591F) (ver Tabla 4.1 de RESULTADOS). En el gen *PPARG* se encontraron 2 mutaciones no descritas (R181S y S410R) (ver Tabla 4.9 de RESULTADOS).

Hasta la fecha se han descrito cerca de 20 mutaciones en el gen *LMNA* que originan FPLD, el 90% de las cuales se localizan en extremo carboxi-terminal de la proteína. Estas son mutaciones dominantes (la mayoría de sentido equivocado), excepto en dos casos: la mutación homocigótica *LMNA* p.T655fsX49 que genera la expresión de una prelamina A alterada, impidiendo su maduración post-traduccion [329], y la mutación heterocigótica compuesta para T528M y S583L [436].

LMNA c.1444C>T, p.R482W

La mayoría de las mutaciones en *LMNA* causantes de FPLD, descritas hasta la fecha, son sustituciones heterocigóticas del codón 482 [440], en el dominio globular C-terminal de la proteína (ver Figura 1.36 de INTRODUCCIÓN), implicado en la unión de la lamina A con el ADN y varios factores de transcripción como SREBP-1c [192] [193] [233].

La mutación R482W (c.1444C>T) en el gen *LMNA* fue descrita por primera vez por Shackleton y colaboradores, en el año 2000, en 6 familias y 3 casos aislados de lipodistrofia parcial [326]. Posteriormente, Schmidt y colaboradores [441], en 2001, identificaron una familia con 14 sujetos que portaban la mutación R482W en *LMNA* y presentaban lipodistrofia parcial, con una dislipidemia temprana y severa. En 2003, nuestro grupo describió [341] la presencia de la mutación lamina A/C R482W en un pedigrí (L.1) con 14 individuos que portaban la mutación, asociada a la aparición de distribución anormal de la grasa corporal, resistencia a la insulina, hipoleptinemia y perfil lipídico aterogénico, en el caso de las mujeres a partir de la pubertad y en los hombres después de los 40 años. Otros estudios han descrito la presencia de esta mutación en pacientes con lipodistrofia parcial y otras patologías asociadas, como distrofia muscular [338] [442] y miocardiopatía [334] [442].

LMNA c.1445 G>A, p.R482Q

La mutación R482Q (c.1445 G>A) en el gen *LMNA* fue descrita por primera vez por Cao y Hegele en 2000 en cinco familias canadienses en las que co-segregaba con el fenotipo lipodistrófico [2]. En ese mismo año otros dos grupos de investigación también identificaron ésta y otras mutaciones de sentido equivocado en el exón 8 [326] [336].

El fenotipo clásico de FPLD2, asociado a ambas mutaciones, R482W y R482Q, se desarrolla en las mujeres después de la pubertad y se caracteriza por lipoatrofia subcutánea en extremidades y tronco, acumulación facio-cervical de grasa, resistencia a la insulina y alteraciones metabólicas con complicaciones cardiovasculares precoces [2] [326]. Las mujeres se ven afectadas más severamente, tanto a nivel clínico como bioquímico [331] [337]. Las pacientes diagnosticadas en nuestro estudio con las mutaciones *LMNA* R482W o *LMNA* R482Q, manifestaban claramente este fenotipo, aunque no todas presentaban pérdida de grasa subcutánea abdominal y resistencia a la insulina.

Se ha visto que en la lamina A/C el residuo arginina de la posición 482 está ampliamente expuesto al solvente y no interactúa con los residuos aminoácidos más cercanos. Esto sugiere

que las mutaciones que originan FPLD no alteran la estructura del dominio “Ig-like” sino que alteran la carga de la superficie expuesta al solvente. Estas mutaciones provocan una disminución de la carga positiva (como en R482W y R482Q) o la aparición de una carga negativa, lo que podría perturbar la interacción de las laminas con una clase específica de pareja biológica, otras proteínas o ADN [191] [192].

Dechat y colaboradores [171], en 2000, describieron la existencia de un dominio entre los residuos 319 y 572 (que incluye al dominio “Ig-like”) de las laminas A/C que se une a la proteína 2 asociada a lamina (LAP2). Posteriormente, Stierle y colaboradores [193] demostraron que existe una gran región cargada positivamente alrededor del aminoácido R482 en la superficie del dominio “Ig-like” que participa en la unión al ADN. Así mismo, se ha demostrado que las mutaciones R482Q y -W reducen la afinidad del péptido por el ADN. Todo ello sugiere que las alteraciones en las interacciones laminas A/C-ADN podrían jugar un papel en la fisiopatología de la FPLD2.

#### LMNA c.1583C>T, p.T528M

La mutación *LMNA* T528M fue descrita anteriormente por Savage y colaboradores, en 2004, en un pedigrí formado por 6 sujetos [436]. La forma heterocigótica compuesta de *LMNA* T528M con la mutación *LMNA* S583L provocaba un fenotipo FPL tipo Dunnigan clásico. Los tres pacientes heterocigotos compuestos presentaban notable escasez de grasa subcutánea en tronco y extremidades. Sin embargo, en este mismo pedigrí, otros dos sujetos portadores de sólo la mutación T528M no eran clínicamente lipodistróficos, aunque ambos presentaban un ligero incremento de los triglicéridos plasmáticos y uno de ellos era diabético e hipertenso.

Posteriormente, otro grupo de investigadores encontraron la mutación T528M compuesta con una mutación no descrita hasta entonces, *LMNA* M540T, en un niño de 2 años con un fenotipo progeroide similar a la progeria de Hutchinson–Gilford (HGPS). Estos autores encontraron alteraciones en los núcleos de los fibroblastos del paciente pero diferentes a los característicos de HGPS. Los padres, heterocigóticos simples para cada una de estas mutaciones, no parecían afectados clínicamente, aunque se observaron alteraciones en la forma de los núcleos de un porcentaje considerable de sus fibroblastos [437].

En las pacientes estudiadas por nosotros, portadoras de la mutación T528M en heterocigosis, no encontramos otra mutación al secuenciar las regiones codificantes de los genes *LMNA* y *PPARG*. Sí presentaban, no obstante, 3 polimorfismos puntuales (SNP) ya descritos: el SNP

sinónimo 566 (nt.1698 C>T) en *LMNA*, el SNP no sinónimo P12A (c.34 C>G) y SNP sinónimo 449 (nt.1347) C>T en *PPARG*, ver apartado 3.1.2. A. y B. de RESULTADOS. El fenotipo lipodistrófico era similar en la madre y la hermana del propositus, y se diagnosticó la misma mutación en esta hermana.

La conservación evolutiva del residuo aminoacídico T528 en la lamina A/C humana (y de otros mamíferos) y de rana (*X. laevis*), en la lamina A de ratón, rata y pollo (ver Figura 4.21 de RESULTADOS), sugiere que este residuo es importante para la función normal de la lamina A/C.

El residuo de treonina en la posición 528 de las laminas A/C se encuentra “enterrado” en una estructura globular formada por un sándwich de hojas beta (<http://www.rcsb.org/pdb>, PDB 1IFR). La treonina es un aminoácido pequeño, cuya cadena lateral es compatible con el sándwich. La sustitución por un aminoácido hidrofóbico de mayor tamaño, como la metionina, podría desestabilizar dicha estructura.

La presencia del polimorfismo no sinónimo *PPARG* p.P12A en estas pacientes con la mutación *LMNA* p.T528M también podría estar influyendo en el fenotipo lipodistrófico que presentan. Los estudios realizados hasta la fecha en pacientes portadores de este polimorfismo son controvertidos. Así, este SNP ha sido asociado con un incremento del IMC en dos poblaciones caucásicas [443], mientras que en otro estudio en una población finlandesa se vio asociado con la disminución del mismo y un incremento de la sensibilidad a la insulina [444]. Sin embargo, el estudio funcional de esta mutación, realizado por Masugi y colaboradores en 2000, mostró que la capacidad de la proteína mutada para activar la transcripción y para inducir adipogénesis en presencia de una TZD se veía afectada (reducida) al compararse con la proteína *wild type* [445]. Este hallazgo sostiene la posibilidad de que la sustitución P12A en el gen *PPARG* pueda estar asociada con la sensibilidad a la insulina y anormalidades en la formación del tejido adiposo, teniendo en cuenta el importante papel que juega *PPARG* en estos procesos.

De cualquier modo será necesario un estudio funcional de esta mutación que permita esclarecer si sólo la propia mutación T528M o su combinación con uno o varios de los polimorfismos encontrados es la responsable del fenotipo lipodistrófico que presentan estas pacientes.



En todo caso, estas diferencias observadas en la relación genotipo-fenotipo ponen una vez más de manifiesto la expresividad variable y la heterogeneidad fenotípica de las mutaciones en el gen *LMNA* [446].

#### *LMNA* c.1634G>A, p.R545H

La sustitución *LMNA* c.1634G>A, p.R545H fue descrita recientemente por Huong en 2010 [438] como una mutación en heterocigosis presente en una familia de Newcastle con distrofia muscular de Emery-Dreifuss. No obstante, aunque la madre del individuo afectado también portaba la mutación en heterocigosis, no se vio afectada por dicha patología, mostrándose así una penetrancia incompleta de esta mutación.

Otra sustitución en este residuo de arginina (p.R545C) se ha visto asociada con un fenotipo severo de distrofia muscular de Emery-Dreifuss [447]. Además, se ha observado que los mioblastos R545C presentaban defectos estructurales en el núcleo y alteraciones en la organización de las laminas A/C y de su pareja de unión en la membrana nuclear interna, la emerina.

Por otro lado, el mismo cambio de aminoácido en un residuo cercano (R541H) se ha visto asociado a miocardiopatía [448], como también lo estuvo la sustitución R>C en el residuo R541 [449].

En nuestra paciente con la mutación *LMNA* R545H el fenotipo asociado que destaca es la distribución atípica de la grasa (ver Figura 4.23 de RESULTADOS) y la diabetes mellitus severa (ver Tabla 4.7 de RESULTADOS) (con antecedentes familiares), acantosis nigricans y acrocordones. No obstante, se dió la circunstancia que en el momento del diagnóstico esta paciente estaba recibiendo altas dosis de glucocorticoides orales (metilprednisolona) como parte del tratamiento por la artritis reumatoide que padecía. Debido a esto la hipótesis diagnóstica inicial fue la de hipercortisolismo crónico exógeno versus lipodistrofia parcial familiar. Posteriormente, una vez retirados los corticoides orales, la paciente siguió presentando cifras elevadas de cortisol libre urinario. Después de las pruebas pertinentes se diagnosticó un adenoma suprarrenal productor de cortisol y fue intervenida por vía laparoscópica (supraadrenalectomía izquierda). En la actualidad, estamos observando la posible modificación del fenotipo. El síndrome de Cushing siempre se plantea en el diagnóstico diferencial de la lipodistrofia parcial familiar debido a la particular distribución de la grasa corporal. No obstante, hay ciertos signos clínicos que orientan razonablemente hacia

una u otra entidad. Así, el hipercortisolismo crónico, a diferencia de la FPLD, suele cursar con plétora facial, estrías violáceas y miopatía proximal. La hipertrofia muscular y la flebomegalia son características de la FPLD. Este caso, pues, resulta sumamente interesante ya que se combinan (o se podrían combinar) dos situaciones clínicas diferentes (hipercortisolismo crónico y FPLD2). Es de esperar que una vez pasado un tiempo prudencial, el fenotipo cushingoide desaparezca, con lo que podremos reconocer el verdadero efecto de esta mutación sobre la distribución del tejido adiposo.

El residuo R545 está localizado en el dominio C-terminal común a ambas proteínas, lamina A y C, dentro de la estructura globular tipo Ig [191] [192]. Se han descrito varias mutaciones entre estos residuos localizados en la superficie del dominio “Ig-like” que provocan lipodistrofia parcial familiar [192] [450] (ver Figura 1.36 de INTRODUCCIÓN). La arginina es un residuo aminoacídico polar cargado positivamente a pH fisiológico. La sustitución por el residuo de histidina, también polar, pero en un 90 % neutro a pH fisiológico, podría afectar las posibles interacciones de la proteína con otras proteínas o el ADN.

El análisis predictivo de esta sustitución (R545H) mediante el programa “Polyphen” reveló que es posiblemente perjudicial. Además, la conservación evolutiva de R545 en la lamina A/C humana (y de otros mamíferos) y de rana (*X. laevis*), en la lamina A de ratón, rata y pollo (ver Figura 4.25 de RESULTADOS), sugiere que este residuo es importante para la función normal de la lamina A/C.

#### LMNA c.895A>G, p.I299V

La sustitución de A por G en la posición 895 del ADNc de *LMNA* (correspondiente al exón 5), supone el consecuente cambio del residuo de isoleucina en la posición 299 (I299) por valina (V) en la lamina A/C (mutación no descrita anteriormente). El cambio de aminoácido que supone es de tipo conservativo pues isoleucina y valina son, ambos, aminoácidos no polares y presentan índices de hidrofobicidad [451] muy similares. Además, el tamaño de la molécula de uno y otro residuo aminoacídico es similar. Sin embargo, en el pedigrí estudiado encontramos que esta mutación segrega con un fenotipo de lipodistrofia parcial familiar atípica, caracterizado, fundamentalmente, por pérdida de grasa en extremidades, exceso de TAsc en abdomen, hipertrofia muscular, hipertensión arterial, resistencia a la insulina severa, hipertrigliceridemia y diabetes mellitus insulino-requiriente de muy difícil control.

Por último, la conservación evolutiva del residuo aminoacídico I299 en la lamina A/C humana (y de otros mamíferos) y de rana (*X. laevis*), en la lamina A de ratón, rata y pollo, sugiere que este residuo es importante para la función normal de la lamina A/C.

LMNA c.1772G >T, p.C591F. Estudio funcional de la mutación.

La detección y el estudio de la nueva mutación heterocigótica *LMNA* C591F en el exón 11, que corresponde con el dominio C terminal de la lamina A, da a conocer otra variante del síndrome de Dunnigan, caracterizada por lipodistrofia parcial, resistencia a la insulina, miocardiopatía hipertrófica y estenosis aórtica grave.

La distribución de la grasa corporal en esta paciente con la mutación C591F, como sucede en las mujeres estudiadas con FPLD clásica (diagnosticadas *LMNA* R482W- Q), fue clínicamente normal hasta la pubertad. Después de la pubertad, la principal característica fenotípica fue una progresiva lipodistrofia parcial, con lipoatrofia subcutánea en extremidades y acumulación de grasa en la cara, cuello y tronco (a diferencia de la forma clásica, en la que se produce lipoatrofia también en el tronco). Previamente, Garg y colaboradores, en 2001 [339] describieron la presencia de una lipoatrofia menos severa en mujeres con FPLD atípica causada por otra mutación (R582H) también localizada en el exón 11 de *LMNA*, respecto a la forma clásica de FPLD, sobre todo en la región del tronco donde no encontraron evidencias de pérdida de TAsc [339]. Además, en estas pacientes los aspectos mediales de la zona proximal de los muslos parecen estar exentos de la pérdida de adipocitos, produciéndose una peculiar acumulación de grasa en estas regiones [339].

Se ha visto que las mutaciones que afectan a las dos productos de *splicing* alternativos, las laminas A y C, dan lugar a un fenotipo con alteraciones más severas que el originado por mutaciones en el exón 11, que sólo afecta a la lamina A [339] [436].

Aún no está claro si la distribución característica del tejido adiposo observada en los pacientes que presentan FPLD con diferentes mutaciones está relacionada con la heterogeneidad en la expresión de las distintas laminas en adipocitos de diferentes localizaciones anatómicas. Hasta el momento sí se ha demostrado que la proporción en los niveles de expresión de las distintas variantes de *splicing* del gen *LMNA* varía significativamente de un tejido a otro [452] [453] [454]. No obstante, falta por esclarecer cuáles son los mecanismos involucrados en la regulación de la expresión relativa de los tres productos de *splicing* del gen *LMNA*. También

se ha visto que existen distintas rutas en el ensamblaje nuclear, al menos, de las laminas A y C [455].

En esta nueva variante del síndrome de Dunnigan se detectó intolerancia a la glucosa, bajos niveles de leptina, resistencia a la insulina y el colesterol LDL elevado. A diferencia de la FPLD clásica, los niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol HDL fueron normales. No se detectó hipertensión arterial ni cardiopatía isquémica. A diferencia de los pacientes con mutaciones en el exón 8 de *LMNA*, tampoco se evidenció hipertrofia muscular ni venas prominentes o acantosis nigricans. Se ha descrito que los pacientes con FPLD atípica tienden a presentar complicaciones metabólicas menos severas y que sus concentraciones séricas de triglicéridos tienden a ser más bajas y las de colesterol HDL más altas respecto a los pacientes con FPLD clásica [339].

En varios estudios previos se han descrito alteraciones cardíacas asociadas con lipodistrofia por mutaciones en *LMNA* [321] [442] [456].

Caux y colaboradores describieron a un paciente con la mutación *LMNA* R133L que presentaba lipodistrofia generalizada, diabetes insulino-resistente y miocardiopatía hipertrófica con afectación de la válvula aórtica [321].

Van der Kooi y colaboradores identificaron una mutación (R527P) en el exón 9 de *LMNA* asociada con una combinación de distrofia muscular, lipodistrofia y alteraciones del ritmo cardíaco. Estos investigadores identificaron, además, la mutación *LMNA* R60G en una madre y su hija con lipodistrofia parcial y afección cardíaca tardía con disfunción ventricular, defecto de la conducción y arritmias [456].

Por su parte, Garg y colaboradores describieron un fenotipo combinado de lipodistrofia parcial familiar y defecto de la conducción y otras manifestaciones relacionadas con miocardiopatía asociado con las mutaciones *LMNA* R28W y R62G [338]. Y Vantyghem y colaboradores describieron la presencia de anormalidades musculares y cardíacas en un grupo de pacientes con FPLD asociada a la mutación *LMNA* R482W, aunque la ocurrencia y severidad de los fenotipos miopáticos y lipodistróficos fue variada y no relacionada [338] [442].

La paciente estudiada por nosotros mostró hipertrofia ventricular izquierda moderada, severa calcificación de la válvula aórtica extendiéndose al ánulo mitral y doble lesión aórtica con estenosis grave. En el caso del hijo, aunque no mostraba distribución anormal de la grasa

como cabría esperar para un niño prepuberal [250] [442], sí se detectó una incipiente alteración de la válvula aórtica.

Nuestros resultados sugieren que la mutación C591F, la cual específicamente altera el carboxilo terminal de lamina A, origina un fenotipo cardíaco diferente al que se asocia con mutaciones en el dominio central “rod” de lamina A/C o en el carboxilo terminal de lamina C [382].

Es posible que las mutaciones localizadas al final del carboxilo terminal de las laminas impidan el ensamblaje de los filamentos de lamina que se produce por el proceso de polimerización de cabeza a cola [394]. La mutación C591F se localiza al final del C-terminal la lamina A en un dominio que ha sido identificado como dominio de unión a la cromatina [394].

La mutación C591F, al estar localizada en el extremo C-terminal de la lamina A, también implica una disminución de la carga positiva en esta región, al sustituirse un aminoácido polar cargado positivamente (cisteína) por un aminoácido apolar (fenilalanina) que podría tener un efecto importante sobre la estructura de la proteína. Particularmente, una sustitución como ésta en la que se elimina un residuo de cisteína, altera el potencial para la formación de puentes disulfuro, lo cual podría causar importantes cambios estructurales. Además, por las características de la fenilalanina, un aminoácido más voluminoso e hidrofóbico, podría no ser bien tolerado en esta región.

Por otro lado, hemos comprobado que el aminoácido cisteína 591 está altamente conservado entre las diferentes especies (ver Figura 4.12 de RESULTADOS), lo cual sugiere que sea funcionalmente importante en la lamina A, y por tanto aumenta la probabilidad de que su sustitución esté asociada con el fenotipo de la enfermedad.

Los mecanismos moleculares a través de los cuales las mutaciones en las laminas A/C conducen a tan notable variedad de fenotipos de enfermedades aún son poco conocidos. Se han planteado numerosas hipótesis que incluyen el aumento de la susceptibilidad al daño celular por estrés mecánico y la regulación diferencial de la expresión génica por interacción con la cromatina nuclear [457] [390] [458]. Otra posibilidad es que pueda existir una interacción anormal entre la lamina A mutada y otras proteínas de la lámina nuclear. Así, se ha demostrado que la región C-terminal de la lamina A (residuos 536–646) se une a la actina, otro componente del nucleoesqueleto [459]. La mutación C591F de lamina A podría reducir

la afinidad por actina, o no interactuar con esta proteína, provocando apoptosis prematura [460]. En este sentido, nosotros observamos agregación de la lamina A y aumento del tamaño del núcleo en preadipocitos de ratón diferenciados y transfectados con la mutación *LMNA* C591F. En la misma línea, otros autores han encontrado anomalías en la morfología de los núcleos de fibroblastos procedentes de pacientes con mutaciones en *LMNA* causantes de FPLD2. Así, Vigouroux y colaboradores, expresando la mutación *LMNA* R482W en fibroblastos humanos normales, observaron que se generaban alteraciones en la forma del núcleo y en las conexiones de las laminas tipo A y B, similar a lo observado en fibroblastos de pacientes con FPLD [461].

También Capanni y colaboradores encontraron anormalidades en la forma de un subconjunto de núcleos (asociados con una inusual organización de la envoltura nuclear) en fibroblastos de piel cultivados de pacientes portadores de la mutación R482L que afecta a las laminas A y C [462].

Con la información obtenida hasta el momento respecto a la localización de las mutaciones en *LMNA* que causan FPLD y su relación con la severidad del fenotipo que originan, podemos sugerir que la FPLD2 típica, en la que se altera la interacción de las laminas A y C con otras proteínas y con la cromatina nuclear, causa un fenotipo más severo que la FPLD2 atípica en la cual sólo lamina A está alterada.

Hasta la fecha se han descrito cerca de 15 mutaciones en el gen *PPARG* que originan FPLD3 [261] [463]. En nuestro estudio hemos identificado 2 nuevas mutaciones, pero no hemos detectado ninguna de las anteriormente descritas.

#### *PPARG* c.542G>A, p.R181Q

En la nueva mutación *PPARG* R181Q que hemos encontrado, se produce un cambio de un aminoácido polar cargado positivamente (arginina) por otro aminoácido con carga neta cero a pH fisiológico (glutamina). A partir del análisis sobre la isoforma 1 de PPAR $\gamma$  cristalizada (<http://www.rcsb.org/pdb>, PDB 3DZY) se sabe que R181 está implicado en el plegamiento de la proteína. Este residuo establece un puente salino con el residuo 455 de ácido glutámico (carga negativa) del otro dominio del receptor. Por tanto, con la sustitución R181Q, es de esperar que la pérdida de la carga positiva de la arginina afecte al correcto plegamiento de la proteína.

El análisis predictivo de esta sustitución (R181Q) mediante el programa “Polyphen” reveló que es probablemente perjudicial. Además, la conservación evolutiva de R181 en el receptor nuclear PPAR $\gamma$  humano (y de otros mamíferos), de rana (*X. laevis*), de ratón, rata y pollo (ver Figura 4.32 de RESULTADOS), sugiere que este residuo es importante para la función normal de PPAR $\gamma$ , factor de transcripción con un papel clave en la adipogénesis.

La paciente diagnosticada con la mutación presentaba una clara distribución anormal de la grasa corporal (con pérdida de grasa en extremidades inferiores y en región glútea), hipertrigliceridemia e hipertensión arterial.

#### PPARG c. 1230C>A, p.S410R

En la isoforma 1 de PPAR $\gamma$  el residuo de serina (aminoácido polar neutro) de la posición 410 está en un entorno polar y el residuo más próximo es la glutamina (Q) 448 (<http://www.rcsb.org/pdb>, PDB 3DZY). La sustitución de serina (S) por arginina (R), mucho más voluminoso y con carga positiva, podría tener un efecto desestabilizador en la proteína.

El análisis predictivo de esta sustitución (S410R) mediante el programa “Polyphen” reveló que es probablemente perjudicial. Además, la conservación evolutiva de S410 en el receptor nuclear PPAR $\gamma$  humano (y de otros mamíferos), de rana (*X. laevis*), de ratón, rata y pollo (ver Figura 4.35 de RESULTADOS), sugiere que este residuo es importante para la función normal de PPAR $\gamma$ .

La paciente diagnosticada con esta mutación presentaba una distribución anormal de la grasa, con acumulación de grasa en la cara, cuello y tronco, y escaso TAsc en extremidades y en la región glútea, hiperlipidemia e hipertensión arterial.

Dado el papel crítico de PPAR $\gamma$  en la adipogénesis y su elevada expresión en el tejido adiposo, las mutaciones de sentido equivocado con efecto de dominancia negativa [344] podrían causar lipodistrofia al afectar la adipogénesis [39]. La dominancia negativa sería un efecto que se debería evaluar al hacer el estudio funcional de estas mutaciones.

En los pacientes con FPLD3 previamente descritos se han identificado mutaciones de dominancia-negativa y de pérdida de función que afectan al dominio de unión a ligando de PPAR $\gamma$ . Las mutaciones P495L, V318M [1] [351], y aquellas que conducen a proteínas truncadas (315X y R357X), alteran la interacción de PPAR $\gamma$  con ligandos y coactivadores. Se han descrito otras mutaciones dominante-negativas (C114R, C131Y, C162W) que afectan el dominio de unión a ADN. Los pacientes se caracterizan por presentar pérdida de grasa en

extremidades y la región glútea, esteatosis hepática, dislipidemia, severa resistencia a la insulina, diabetes, hipertensión y complicaciones cardiovasculares [384].

La deficiencia de PPAR $\gamma$  debido a haploinsuficiencia puede también contribuir al fenotipo FPLD3. Se han descrito otras 5 mutaciones en PPAR $\gamma$  (185stop, C190S[464], Y355X [346], F388L [347], R425C [3], D424N [465] presentes en pacientes lipodistróficos. Éstas inducen cambios conformacionales en dominios de unión a ligando (Y355X, F388L, R425C) o a ADN (185stop, C190S, R194W [350], y como consecuencia se ve afectada la transactivación de PPAR $\gamma$ .

La mayoría de los pacientes lipodistróficos portadores de mutaciones en PPAR $\gamma$  presentan hipertensión severa [1] [384], lo que evidencia el papel crítico de PPAR $\gamma$  en la regulación de la presión arterial.

Todas las nuevas mutaciones que hemos encontrado en nuestro estudio han estado ausentes en 100 cromosomas de pacientes sanos analizados como controles.

En el resto de las mujeres estudiadas con sospecha de FPLD no encontramos ninguna mutación en las regiones codificantes de los genes *LMNA* o *PPARG*. Si bien existe la posibilidad de que estas pacientes presenten mutaciones en otros genes asociados a FPLD (*AKT2*, *PLIN1* o *CIDEA*), dadas las características clínicas de estas mujeres esto no parece probable. No obstante, en la actualidad estamos concluyendo la secuenciación de éstos y otros posibles genes candidatos mediante técnicas de ultrasecuenciación. Dicho esto, dadas las características: antropométricas, de composición corporal, clínicas, bioquímicas y los antecedentes familiares de estas pacientes, podríamos clasificar esta forma atípica de lipodistrofia parcial como FPLD1 o lipodistrofia tipo Köbberling. FPLD1 se caracteriza por pérdida de grasa exclusiva de las extremidades, con distribución normal o incremento de la grasa de la cara, cuello y tronco [323] [324] (ver Figura 1.33 de INTRODUCCIÓN). Hasta la fecha no se ha identificado un locus asociado con FPLD1.

Herbs y colaboradores en 2003 identificaron a un grupo de 13 mujeres (no relacionadas) con características clínicas de FPLD1. Las pacientes presentaban escasa grasa subcutánea en extremidades y caderas, mientras que tenían una notable obesidad troncular. Los pliegues cutáneos (PC) de las extremidades superiores e inferiores fueron significativamente menores respecto a los controles. Consecuentemente la fracción de PC de abdomen/muslo fue significativamente mayor en estas pacientes. También presentaban componentes del síndrome



metabólico como hipertensión, resistencia a la insulina e hipertrigliceridemia severa. Un alto porcentaje padecía de enfermedad cardíaca precoz. No se encontró ninguna mutación en las regiones codificantes de *LMNA* o *PPARG*. Estos autores concluyeron que FPLD1 es más común de lo que se había descrito anteriormente, que realmente está sub-diagnosticada y destacan la importancia de su diagnóstico temprano para prevenir la pancreatitis asociada a hipertrigliceridemia y la enfermedad cardíaca temprana.

Como se describe en el apartado 4.1.3.A. de RESULTADOS y se discute en los siguientes párrafos, en nuestra población objeto de estudio, el grupo con sospecha de FPLD sin diagnóstico molecular presenta unas características muy similares a las descritas por Herbs y colaboradores.

Estas mujeres con lipodistrofia parcial atípica y sin diagnóstico molecular que hemos clasificado como FPLD1 presentaban una distribución anormal de la grasa corporal, con acumulación de grasa en tronco y escaso TAsc en extremidades inferiores (ver Figura 4.36 de RESULTADOS), así como una alteración del metabolismo hidrocarbonado y lipídico. Las pacientes diagnosticadas molecularmente como FPLD tenían menor grasa total (y en las diferentes regiones del cuerpo), menores concentraciones de leptina plasmática y mayor hipertrigliceridemia; si bien aquellas diagnosticadas genéticamente con FPLD atípica presentaban mayor grasa total (y en las diferentes regiones del cuerpo), con respecto a las pacientes con FPLD típica. Podríamos decir que las pacientes FPLD atípicas presentan un fenotipo que es bastante similar al de las pacientes con sospecha de FPLD en las que no se encontró ninguna mutación en las regiones codificantes de los genes estudiados, *LMNA* o *PPARG*.

Otros estudios demuestran que la fracción: composición de la grasa corporal central/ grasa corporal periférica, determinada por DEXA, podría ser útil para la identificación de pacientes con lipodistrofia parcial [466] [467] [468]. Este parámetro refleja la relación androide-ginoide de la grasa.

En nuestra población objeto de estudio la fracción grasa corporal central/ grasa corporal periférica se hace significativamente más androide en las pacientes con sospecha de FPLD respecto a las mujeres del grupo control (ver Tabla 4.15 y Figura 4.37 de RESULTADOS), especialmente al comparar el subgrupo de las pacientes no-menopáusicas (ver Tabla 4.28 y Figura 4.43). En el caso de las mujeres menopáusicas con sospecha de FPLD estas diferencias

no fueron significativas respecto al correspondiente subgrupo control; lo cual es de esperar ya que en las mujeres menopáusicas en condiciones fisiológicas normales hay una tendencia a la redistribución androide de la grasa relacionada con la disminución de la síntesis de estrógenos e incremento de los niveles de testosterona [469].

Cuando comparamos los grupos de alta y baja sospecha de FPLD encontramos que las pacientes del primer grupo (con más escasez de grasa en EEII), presentan mayor concentración de glucosa basal y el porcentaje de hiperlipidemias tipo IIa (hipercolesterolemia familiar) fue mayor.

Otros estudios también demuestran que pacientes con pérdida de grasa en la parte inferior del cuerpo presentan alteraciones metabólicas más graves [470], lo cual es coherente con el papel beneficioso que se le ha atribuido a la grasa de las extremidades inferiores, a nivel metabólico. Se ha visto que la pérdida de grasa glúteo-femoral que se observa en algunos síndromes lipodistróficos está asociada con un incremento del riesgo a padecer alteraciones metabólicas y cardíacas. Ello subraya un papel determinante de esta grasa para la salud, mediante el almacenamiento a largo plazo del exceso de ácidos grasos, protegiendo así al organismo de los efectos adversos asociados con la deposición ectópica de la grasa (en hígado, páncreas y músculo) [471].

Respecto a los polimorfismos encontrados en *LMNA*: S17S, L204L, A287A, D446D y H566H, habían sido anteriormente descritos y registrados (como rs11549668, rs12117552, rs538089, rs505058 y rs4641, respectivamente) en las bases de datos SNP DB y Leiden MD. Para los cuatro primeros, no aparece registrado ningún comentario de patogenicidad conocida. En el caso del SNP rs4641, que afecta la tercera base del codón 566 (sustitución C>T) previo al sitio de *splicing* alternativo que da lugar a las laminas A y C, ha sido asociado con el síndrome metabólico o sus componentes. Aunque, los resultados entre diferentes estudios y poblaciones son controvertidos. El alelo T se ha visto asociado con un aumento del riesgo de padecer el síndrome metabólico en una población Norteamericana Amish [419], sin embargo, entre británicos no se obtuvieron diferencias significativas en los individuos con esta variante polimórfica al estudiar su asociación con la DM2 y los componentes del síndrome metabólico [422]. En una población danesa el alelo T se ha visto asociado con un incremento en las concentraciones de glucosa basal [420], mientras que se observó una relación inversa en una población europea no-danesa [422]. En esta misma población europea no-danesa los

triglicéridos presentaron una tendencia a la disminución en los individuos con el alelo T, mientras que la relación fue inversa en poblaciones norteamericana Amish y japonesas [419] [423] [472]. Por otro lado, sí se ha visto que este alelo está asociado con una tendencia al incremento del IMC y de otros parámetros antropométricos relacionados con la obesidad, incluso en poblaciones con orígenes étnicos diferentes [473] [474].

En nuestra población, se vieron diferencias significativas en las frecuencias de las variantes genómicas de los SNPs L204L, A287A y D446D entre pacientes FPLD y controles, sin embargo, no se observaron cambios significativos relacionados con patogenicidad en parámetros antropométricos, de composición corporal, clínicos o bioquímicos, respecto a los individuos que no portan el polimorfismo dentro del mismo grupo, control o FPLD.

Debido al reducido tamaño de la muestra, no hemos podido establecer si la mayor frecuencia de estos SNPs en los pacientes con mutaciones en *LMNA* causantes de FPLD es debido a un desequilibrio de ligamiento o si su presencia puede modular/modificar la expresividad fenotípica de la lipodistrofia parcial familiar. Esto último está particularmente referido al SNP L204L, que no ha sido encontrado en ninguno de los controles estudiados.

Por su parte, el análisis de estos polimorfismos en el programa de predicción de sitios de *splicing* NetGene2 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>, no reveló cambios en las probabilidades de sitios de *splicing* entre unas variantes y otras.

### **Diferencias en la expresión de adipogenes y prelamina A, dependientes de la región anatómica, en TAsc de pacientes FPLD2**

La pérdida del tejido adiposo subcutáneo (TAsc) en FPLD2 se produce en determinadas regiones anatómicas (brazos, piernas y tronco), mientras que se acumula grasa en la cara y el cuello [151]. No obstante, en los pacientes estudiados por nosotros cuando éstos ganan peso acumulan también TAsc en el abdomen. Hasta la fecha, la causa de estas diferencias regionales no ha sido identificada, si bien existe un número creciente de estudios que demuestran la presencia de diferencias intrínsecas significativas en las propiedades de las células del tejido adiposo de depósitos anatómicos específicos [475] [476] [477].

Con el fin de identificar posibles diferencias moleculares en el tejido adiposo de los pacientes con FPLD2 procedente de diferentes regiones anatómicas, procedimos a analizar la expresión de los principales adipogenes así como la presencia de prelamina A, forma inmadura de la lamina A, en estas muestras.

En nuestro estudio de expresión génica la expresión relativa del gen *LMNA* fue similar en los individuos controles y FPLD2, tanto en TAsc de abdomen como de muslo; tampoco hubo diferencias en la expresión de *LMNA* entre el TAsc de estas dos localizaciones anatómicas dentro de cada grupo de sujetos estudiados. Lelliott y colaboradores anteriormente habían encontrado que los niveles de ARNm de lamina A/C eran similares en adipocitos maduros y preadipocitos de depósitos omental, subcutáneo y del cuello procedentes de sujetos controles [478].

Nuestros resultados muestran una acumulación de prelamina A en la envoltura nuclear de células del TA de pacientes con lipodistrofia, siendo dicha acumulación más notable en el TA de muslo, es decir, en las zonas más lipoatróficas. Por su parte, la presencia de prelamina A fue casi indetectable en el TA del muslo de los individuos controles. En un estudio previo, Caron y colaboradores encontraron alterado el procesamiento de la prelamina A en el TAsc de la región cervical procedente de pacientes con FPLD2 o lipodistrofia parcial adquirida [479].

En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias en la expresión relativa del gen *SREBP1c* en TAsc, entre controles y pacientes con lipodistrofia. En cambio, sí observamos que la expresión relativa de *PPARG* fue significativa y drásticamente menor en TAsc del muslo de pacientes FPLD2. La posible implicación de SREBP1c en la patogenia de la FPLD2 procede de 2 estudios en los que se demostró que SREBP-1C puede unirse a la lamina A *in vitro* [233] y que este factor de transcripción se une a la prelamina A no farnesilada [239]. En un trabajo seminal, Boguslavsky y colaboradores [480] demostraron que la sobreexpresión del gen *LMNA wild-type* en preadipocitos murinos impedía la diferenciación a adipocitos maduros, reduciendo la expresión de PPAR $\gamma$  y GLUT4. Estos resultados también se observaron al transfectar estas células con *LMNA* mutante (R482W o R482Q). Sin embargo, estos autores no encontraron que esta sobreexpresión ejerciera algún efecto sobre los niveles de ARNm de *SREBP1c*. Esto parece implicar que los efectos de la sobreexpresión de *LMNA* tendrían lugar después de la traducción. Otros autores han propuesto que la activación de PPAR $\gamma$  y SREBP-1C en los adipocitos se lleva a cabo por rutas paralelas [481], lo cual podría explicar la presencia de ARNm de SREBP-1C y la ausencia (o muy baja expresión) del ARNm de PPAR $\gamma$ 2.

Por otro lado, se ha descrito que los precursores de adipocitos que acumulan prelamina A retienen o secuestran SREBP1 activo en la lámina nuclear, lo que apoya la idea de que la interacción SREBP1-prelamina A tiene un papel fisiológico en la regulación negativa de la

translocación nuclear de SREBP1 en el TA, y que el exceso en la acumulación de la prelamina A secuestra selectivamente a SREBP1 en la envoltura nuclear de los adipocitos y disminuye la expresión de PPAR $\gamma$  [239] [482] [483].

PPAR $\gamma$  es un factor de transcripción clave en la adipogénesis [484] [485]. Se ha visto que la reducción de la expresión de *PPARG2* en células 3T3-L1 conduce a una reducción significativa en la capacidad adipogénica de estos preadipocitos [486]. En preadipocitos 3T3-L1 con *PPARG2* silenciado se bloquea totalmente la acumulación lipídica en las células [486], y ratones con *PPARG* inactivado en dominancia negativa muestran adipocitos hipoplásicos [487]. Además, ciertas mutaciones en *PPARG* conducen a FPLD tipo 3 en humanos [3].

En nuestro estudio encontramos que la expresión génica de *PPARG* estaba reducida en un 67% en TAsc de muslo de pacientes con FPLD2, y consecuentemente, estaba reducida también la expresión de LPL y GLUT4. Estos resultados son coherentes con los hallazgos de los estudios *in vitro* citados anteriormente.

En resumen, los resultados obtenidos en varios estudios previos [239] [480] [488] y nuestros actuales hallazgos, muestran que la actividad transcripcional relacionada con la adipogénesis está alterada en FPLD2, y que la acumulación de prelamina A podría interferir con la expresión de PPAR $\gamma$  [239].

Debido al escaso TAsc que se encuentra en la zona del muslo de los pacientes con FPLD2 estudiados se podría pensar que la baja expresión de los genes pro-adipogénicos se deba a la presencia de una mayor proporción de fibroblastos en el TA del muslo de estos pacientes. Para excluir esta posibilidad analizamos la expresión del gen LPL, que codifica para la enzima lipoproteína lipasa y cuya actividad es determinante en el almacenamiento de triglicéridos en el adipocito [489]. La expresión de este gen es prácticamente indetectable en fibroblastos, mientras que en el TA lipodistrófico, aunque está reducida, se mantiene en el mismo orden de magnitud que en el TA normal. Estos resultados nos llevan a concluir que la posible influencia de la presencia de fibroblastos en el tejido adiposo lipodistrófico resulta insignificante en los resultados de expresión obtenidos.

En nuestro estudio, también encontramos alterada la transcripción de otros genes relacionados con la diferenciación como RB1, que codifica para la proteína del retinoblastoma, pRb. Esta

proteína regula la progresión del ciclo celular en la transición de fase G1→S por inhibición de la actividad de los factores de transcripción tipo E2F [490]. Se ha visto que las laminas tipo A son necesarias para el anclaje nuclear de pRb [237] y que pRb juega un papel importante en la diferenciación de los adipocitos [491] a través de la modulación de la expresión y actividad de PPAR $\gamma$  [492].

Nosotros encontramos que la expresión relativa del gen RB1 estaba reducida en un 20% en el TA del muslo de pacientes con lipodistrofia (respecto a los controles), y que esta expresión estaba también reducida en un 31% con respecto al TA abdominal de los mismos pacientes. Estas diferencias de expresión entre las dos localizaciones anatómicas no se observaron en los individuos controles. La causa de estas diferencias no está clara, pero se podría sugerir una posible relación entre pRb y la aromatasa, dependiente de la localización anatómica. Así, estudios en ratones transgénicos han revelado que una sobre-expresión de la aromatasa se asocia con una disminución de la expresión de varios genes supresores de tumores, como RB1, en glándulas mamarias [493] [494]. Además, se ha demostrado que la expresión de la aromatasa en el TAsc varía entre las distintas localizaciones anatómicas [495].

El papel de pRb en la diferenciación de los adipocitos es complejo. La proteína pRb es inactivada por fosforilación a través de quinasas dependientes de ciclinas y, como consecuencia, se produce la activación de los genes dianas de E2F. Se ha visto que la proteína pRb está hiperfosforilada después de la inducción hormonal de los preadipocitos, coincidiendo con un ciclo celular activo en etapas tempranas de la adipogénesis [496]. Sin embargo, la inactivación de pRb provoca la inhibición de la adipogénesis [497]. Por otra parte, fibroblastos deficientes de pRb no son capaces de diferenciarse en adipocitos cuando son sometidos a una adecuada estimulación [491]. Estos datos apuntan a un papel crucial de esta proteína controladora del ciclo celular en la adipogénesis.

Johnson y colaboradores encontraron que los niveles de pRb estaban drásticamente disminuidos en células derivadas de ratones *Lmna*<sup>-/-</sup> y que la proteína pRb remanente tenía una localización alterada [498]. Estos autores demostraron que las laminas tipo A protegen a pRb de la degradación proteosómica, por lo que cabe la posibilidad de que los síndromes de distrofia que se originan por mutaciones en *LMNA* se deban, al menos en parte, a una función de pRb desregulada. Sin embargo, Nitta y colaboradores no encontraron evidencias que

apoyen la hipótesis de que una alteración en la función de pRb esté asociada con el desarrollo de las laminopatías [400].

Los complejos ciclina tipo D-CDK4/CDK6 fosforilan e inactivan proteínas de crecimiento o supresoras de tumores de la familia de pRb. Recientemente, Mariappan y colaboradores describieron que la ciclina D3 se une al dominio globular de la región de la cola, común a las laminas A y C [499].

Por su parte, Sarruf y colaboradores demostraron que se produce una gran inducción de la expresión de ciclina D3 durante las etapas terminales de la adipogénesis de 3T3-L1 [141]. Estos autores identificaron a ciclina D3 como un coactivador de PPAR $\gamma$ . En nuestro estudio, la expresión relativa del gen CCND3 estaba reducida un 38% en el TAsc del muslo de pacientes con lipodistrofia. En los individuos controles la expresión de los genes CCND3 y PPARG fue mayor en grasa periférica que en TA central (164% y 145%, respectivamente). Estas diferencias se minimizaron en los pacientes con lipodistrofia.

Paradójicamente, la expresión del gen CCND1, que codifica para la ciclina D1, estaba reducida en el TA de ambas localizaciones anatómicas en nuestros pacientes con FPLD2. Wang y colaboradores describieron que la ciclina D1 inhibe la actividad reportera dependiente de PPAR $\gamma$  y que la reducción en la expresión de la ciclina D1 en diferentes células ciclina D1-/- está asociada con una inducción de la expresión de PPAR $\gamma$  y que la reintroducción de la ciclina D1 en las células ciclina D1-deficientes elimina el fenotipo pro-adipogénico [500].

Estos hallazgos apuntan a que la ciclina D1 tiene un papel clave como inhibidor de la actividad funcional específica de PPAR $\gamma$ . Es por ello que nuestros resultados podrían explicarse considerando que al haber una expresión reducida de PPAR $\gamma$  en el TAsc de estos pacientes se requiera de niveles menores de ciclina D1 para regular su actividad.

Numerosos estudios en modelos celulares y animales muestran una importante participación de las células madre en el mecanismo patogénico de las laminopatías [501] [364] [417], así como la participación de proteínas relacionadas con estos trastornos (como emerina y prelamina A) en la diferenciación de miocitos o adipocitos [239] [502]. De modo coherente con estos hallazgos, nuestro estudio demuestra que varias proteínas conocidas por jugar un papel clave en la salida del ciclo celular o en el compromiso para la diferenciación, como pRb y PPAR $\gamma$ , no se expresan adecuadamente en tejidos FPLD2. Nuestros hallazgos son

relevantes para entender la patogénesis de la FPLD2, pues se muestra por primera vez que los procesos relacionados con la diferenciación podrían estar afectados *in vivo* en el TA humano.

Relacionando los distintos resultados obtenidos, podemos decir además que observamos una correlación entre el índice de sensibilidad a la insulina ( $S_I$ ) con la expresión de los genes PPARG y RB1. Correlación ésta que coincide parcialmente con estudios previos [503] [504]. Yang y colaboradores también encontraron una expresión menor del gen RB1 en TAsc de individuos insulino-resistentes al compararse con individuos sensibles a la insulina, así como una correlación positiva entre RB1 y el consumo de glucosa mediado por la insulina [503]. Por su parte, Dubois y colaboradores encontraron que la expresión de PPARG2 en TAsc de individuos diabéticos insulino-resistentes era significativamente menor comparada con individuos controles [504].

Estos estudios se realizaron en TAsc de abdomen, sin embargo nosotros encontramos diferencias en la expresión de los genes PPARG y RB1 sólo en TAsc periférico, no en TAsc abdominal. Las razones para tal discrepancia no son obvias. El tamaño de la muestra o las características intrínsecas de la lipodistrofia parcial familiar podrían ser posibles explicaciones. Sin embargo, en nuestro estudio, el gen *SLC2A4* (GLUT4), controlado por PPARG y directamente relacionado con el consumo de glucosa, sí tenía menor expresión en TAsc abdominal de pacientes FPLD2. Teniendo en cuenta que la característica principal de la FPLD2 es la distribución anormal de la grasa, la cual es diferente a la que presentan los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 u obesidad, cabría esperarse que existan algunas diferencias en la expresión génica.

Hace ya unos años, se describió que el polimorfismo FTO rs9939609 está relacionado con el IMC y predispone a la obesidad [505], y que la expresión del ARNm de *FTO* en TA es específica del depósito de grasa [506]. Sin embargo la función de la proteína que se traduce no se conoce. Nosotros encontramos una menor expresión del ARNm de *FTO* en el TA de muslo de los pacientes con lipodistrofia. Pero las posibles implicaciones de este hallazgo en la adipogénesis no están claras.

En su conjunto, estos hallazgos sugieren que a partir de las mutaciones de *LMNA* que causan FPLD se producen efectos sobre factores adipogénicos, los cuales podrían estar regulados de modo diferente en cada área del cuerpo.



### **Alteraciones ultraestructurales en las células del TAsc de pacientes FPLD2**

En nuestro estudio encontramos una distribución anormal de la heterocromatina en el núcleo de los adipocitos procedentes de pacientes con FPLD2. Capanni y colaboradores describieron hallazgos similares en los núcleos de fibroblastos FPLD2 [462]. Sin embargo, a diferencia de nuestros resultados, ellos no encontraron ningún engrosamiento de la lámina nuclear.

Otros estudios realizados en fibroblastos de pacientes con HGPS [231] [232] y de pacientes con MAD [398] también revelaron irregularidades en la distribución de la heterocromatina y la presencia de una lámina nuclear anormalmente gruesa en estas células, siendo HGPS y MAD también laminopatías asociadas con el gen *LMNA* que cursan con lipodistrofia.

En 2006, Raz y colaboradores sugirieron que cambios en la estructura de la lámina nuclear podrían provocar la reorganización de la heterocromatina [396]. Además, se ha propuesto que la lámina nuclear proporciona un sitio de acoplamiento molecular para la heterocromatina periférica [232].

### **Caracterización histológica y molecular de la lipomatosis asociada a FPLD2**

La presencia de lipomas en pacientes con FPLD2 es un fenómeno que rara vez se ha descrito en la literatura [332]. Sin embargo, en la experiencia clínica de nuestro grupo, hemos notado que la presencia de estos tumores no es infrecuente en los pacientes con FPLD2.

En nuestro estudio no encontramos diferencias histológicas notables con la tinción de HE, pero, llamativamente, los adipocitos de los lipomas lipodistróficos fueron más grandes que aquellos provenientes del resto de las muestras estudiadas. Los adipocitos del TA perilipomatoso de pacientes FPLD2 fueron también más grandes con respecto a los adipocitos procedentes de los sujetos controles. El hallazgo de adipocitos más grandes en el TA lipodistrófico podría parecer raro; sin embargo Wojtanik y colaboradores [371] encontraron adipocitos hipertróficos en los depósitos de TA blanco de un modelo de ratón transgénico FPLD2. Nuestra hipótesis es que la pérdida de TA en estos pacientes origina un aumento de tamaño de las células que se conservan en el tejido, como un recurso para garantizar el almacenamiento del exceso de energía en forma de triglicéridos. Curiosamente, en un estudio reciente Béréziat y colaboradores encontraron una disminución en el tamaño de los adipocitos en muestras de TAsc hipertrófico de cuello, procedentes de pacientes FPLD2 [507].

A la luz de estos hallazgos histológicos y de la falta de expresión de UCP1 (marcador característico del tejido adiposo marrón), podríamos descartar razonablemente la hipótesis de que el TA lipomatoso de pacientes con FPLD2 podría estar asociado con un fenotipo similar

al del TA pardo. Sin embargo, muy recientemente, un trabajo de nuestro grupo en estrecha colaboración con la Dr Giovanna Lattanzi en Bolonia apunta la posibilidad que de que el exceso de grasa en ciertas zonas del cuerpo en estos pacientes (sotabarba) sea debido a un proceso de transdiferenciación desde precursores de grasa parda y miocitos a adipocitos blancos provocado por la acción paracrina de ciertas citocinas como el TGFbeta2 (datos pendientes de publicar, Ortolani *et al.*, A TGFbeta 2 dependent mechanism of adipocyte precursor trans-differentiation in Familial Partial Lipodystrophy Type 2. Hum. Mol. Genetics, 2012, enviado a la revista).

El TA lipodistrófico mostró infiltración de macrófagos (adoptando forma de corona, “crown-like arrangements”) y células T, característica de la inflamación crónica de grado bajo que se asocia con la obesidad insulino-resistente [508], aunque estos hallazgos no fueron corroborados por todos los estudios de marcadores inflamatorios (ver discusión más adelante). Aún así, se ha visto que la grasa lipodistrófica presenta algunas características de otros trastornos que cursan con resistencia a la insulina. Así, en estudios previos, se ha descrito un incremento en los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias y macrófagos en TAsc de pacientes con lipodistrofia asociada al VIH [509]. Además, se ha encontrado un incremento de las citoquinas circulantes e infiltración de macrófagos en depósitos de TA blanco de ratones transgénicos aP2-nSREBP-1c, un modelo de lipodistrofia bien establecido, lo que sugiere la presencia de inflamación sistémica [510].

Este estado de inflamación crónica de bajo grado parece ser consecuencia de la pérdida de TA característica de FPLD2. Así, los adipocitos de mayor tamaño [508] y el exceso de ácidos grasos libres [333], sin excluir la posible participación de otros factores (citoquinas, quimoquinas), podrían actuar promoviendo la migración, diferenciación y proliferación de macrófagos.

En el caso de los lipomas no lipodistróficos, no se encontraron datos que indiquen la presencia de inflamación, coincidiendo con lo descrito anteriormente por Suga y colaboradores [511].

En cuanto al estudio de la función mitocondrial, el hallazgo más notable fue la significativa reducción de la expresión de SIRT3, pero sólo en lipomas de los pacientes FPLD2. La sirtuina 3 (SIRT3) es una proteína que forma parte de una familia de des-acetilinas dependientes de NAD<sup>+</sup> que median respuestas adaptativas a una variedad de estrés, como la restricción

calórica y el estrés metabólico. SIRT3 está localizada en la matriz mitocondrial donde regula los niveles de acetilación de enzimas metabólicas, como la acetil coenzima A sintetasa. Se ha demostrado además que SIRT3 regula el metabolismo oxidativo de los ácidos grasos [439].

Otros autores ya han descrito alteraciones mitocondriales, como la disminución de la expresión de proteínas de la cadena respiratoria, en células con mutaciones en *LMNA* [479]. Además, la lipomatosis ha sido asociada, en algunos casos, con la alteración del ADN mitocondrial debido a mutaciones en el propio ADN mitocondrial [512] o a trastornos mitocondriales que se producen como efectos secundarios del tratamiento anti-retroviral [513]. Aunque no se conocen las razones por las cuales se producen estas alteraciones, la producción anormal de energía debido a una expresión inapropiada de los componentes de la cadena respiratoria o reguladores de la oxidación lipídica, como SIRT3, podrían provocar una respuesta proliferativa en los depósitos de adipocitos.

Respecto a los genes y proteínas involucradas en la adipogénesis, el TA no lipomatoso y lipomatoso de los pacientes lipodistróficos mostró una menor expresión de prácticamente todos los adipogenes estudiados, pero sólo en las muestras procedentes de áreas lipoatróficas. Estos resultados coinciden con nuestros estudios previos [514]. Respecto al análisis de la expresión proteica, los niveles de C/EBP $\beta$  estaban reducidos en todas las muestras de grasa lipodistrófica analizada, fundamentalmente en aquellas provenientes de áreas lipoatróficas.

El proceso de diferenciación de adipocitos implica la expresión secuencial de los factores de transcripción C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ , PPAR $\gamma$  y C/EBP $\alpha$ . La inducción de C/EBP $\beta$  y C/EBP $\delta$  se produce rápidamente después de la iniciación de la adipogénesis; estos factores inducen la expresión de una segunda tanda de genes que incluye a los dos principales factores adipogénicos, C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$  [17]. Es por ello que la familia de factores de transcripción C/EBP tiene un papel crítico en la adipogénesis [515] [121] [372]. Aunque los estudios en cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de ratones C/EBP $\beta$  ( $-/-$ )· $\delta$ ( $-/-$ ) demostraron la necesidad de estos factores de transcripción para completar la diferenciación del adipocito [121], nuestros hallazgos sugieren que, a pesar de la importante supresión de C/EBP $\beta$  y de los bajos niveles de expresión de los transcritos de PPARG y CEBPA en la grasa lipodistrófica, estos transcritos se traducen en la suficiente medida como para mantener unos niveles de la proteína cercanos a la normalidad y un fenotipo casi normal en el escaso TA de los pacientes lipodistróficos.

Según los resultados de expresión observados en nuestro estudio, *TP53*, *SREBF1*, *CEBPA* y *SLC2A4* son los principales genes implicados en el proceso adipogénico de los lipomas no lipodistróficos. La expresión génica en los lipomas lipodistróficos fue diferente, fundamentalmente en aquellos procedentes de áreas lipoatróficas en los cuales varios adipogenes estaban severamente sub-expresados. Estos hallazgos sugieren que existen otros factores implicados en el proceso de proliferación celular de los lipomas lipodistróficos, al menos en aquellos procedentes de áreas lipoatróficas. En contra de lo que se esperaba, no se encontraron diferencias notables en la expresión de los genes *PPARG* o *CEBPB* cuando fueron comparados con las correspondientes muestras de grasa no lipomatosa. Sin embargo, la expresión de *CEBPA* tendió a incrementarse en el tejido lipomatoso.

En estudios realizados por otros autores [512] [511] [516], sobre la expresión de los principales factores adipogénicos en lipomas no lipodistróficos, los resultados fueron variados. Así, Guallar y colaboradores [512] encontraron una menor expresión de *PPARG* en el tejido adiposo de lipoma, mientras que Suga y colaboradores [511] y Dreijerink y colaboradores [516] no encontraron diferencias significativas. Por otro lado, Guallar y colaboradores [512] encontraron un incremento en la expresión de *CEBPA*, en al menos uno de los tres lipomas analizados.

Un hecho interesante en nuestro estudio es que el patrón de la expresión génica en los lipomas no lipodistróficos y lipodistróficos fue similar, aunque a un nivel más bajo en estos últimos. Este hallazgo podría indicar que ambos tipos de tumores comparten mecanismos similares en la diferenciación de adipocitos.

Como ya se ha dicho anteriormente, se ha sugerido que los posibles mecanismos patogénicos de las laminopatías que cursan con lipodistrofia podrían estar relacionados con un fallo de la diferenciación de las células madre adultas y con la toxicidad de la prelamina A, que conducen a senescencia [148]. En nuestro estudio analizamos dos factores principales en el control del ciclo celular, p53 y pRb. Encontramos que la cantidad de p53, y su diana p21, estaba notablemente reducida en el TA, tanto de lipomas como de grasa peri-lipomatosa de los pacientes lipodistróficos. Además de su papel induciendo la detención del ciclo celular, la apoptosis y senescencia, se ha establecido que p53 inhibe la diferenciación adipogénica de células progenitoras mesenquimales mediante la regulación negativa de *PPARγ* y

C/EBP $\alpha$ [517]. Por lo tanto, esperaríamos encontrar una inducción de p53 en las muestras de grasa lipodistrófica. Sin embargo, teniendo en cuenta la apariencia histológica relativamente normal de estas muestras, nuestros resultados sugieren que la ruta metabólica de p53 está actuando como un mecanismo compensatorio que promueve la adipogénesis en el escaso TA presente en estos pacientes. Al respecto, Yahagi y colaboradores encontraron que los genes p53 y p21 estaban altamente inducidos en adipocitos de ratones ob/ob, provocando una regulación negativa de SREBP1 y otros genes lipogénicos [518]. Estos autores sugieren que la activación de p53 podría formar parte de un lazo de retroalimentación negativa contra el exceso de acumulación de grasa en los adipocitos.

Aunque la proliferación y diferenciación han sido considerados como eventos mutuamente excluyentes, durante el programa de diferenciación de adipocitos se ha establecido una estrecha relación entre ambos procesos celulares [95].

En nuestro estudio encontramos muy reducida la cantidad de pRb fosforilada (pRb-P) en muestras de grasa lipodistrófica (lipoma y peri-lipoma). No se encontraron diferencias en la expresión de pRb-P entre el TA lipomatoso y no lipomatoso de sujetos no lipodistróficos. La proteína pRb regula la progresión del ciclo celular en la transición de fase G1→S por inhibición de la actividad de los factores de transcripción tipo E2F, en una regulación dependiente de fosforilación [490]. La importancia de pRb en la diferenciación de los adipocitos se ha hecho evidente en la incapacidad de fibroblastos deficientes de pRb para llevar a cabo la conversión a adipocitos [491]. Sin embargo, como ya se ha dicho, el papel de pRb en la adipogénesis es complejo. Donner y colaboradores [519] describieron que el complejo LAP2 $\alpha$ -lamin A/C es crítico para la entrada, mediada por pRb, de células madre adultas a un estado post-mitótico, aunque no se requiere para la diferenciación terminal de los adipocitos. Sin embargo, la posibilidad de que la menor cantidad de pRb-P encontrada sea una consecuencia de la lamina A/C mutada y que ésta contribuya a una menor eficiencia en la diferenciación de los adipocitos, es una interrogante a la cual no es posible responder a partir de nuestros datos. Un factor como la variabilidad del IMC entre los pacientes FPLD es una limitación en este estudio. Los pacientes con mutaciones distintas en LMNA difieren medianamente en el IMC; por lo cual un estudio posterior con valores más equiparables de este parámetro, tanto en pacientes como en controles, podría ayudar a darle mayor solidez a tales conclusiones.

Nosotros encontramos una acumulación de prelamina A en las muestras de grasa lipodistrófica. La acumulación de lamina A inmadura fue descrita previamente en FPLD2, tanto en estudios *ex vivo* como *in vitro* [239] [514]. Se ha visto que la prelamina A está involucrada en el daño que sufre la adipogénesis en esta laminopatía mediante el secuestro de SREBP1c, un factor de transcripción implicado en la diferenciación adiposa [239]. Nuestros resultados sugieren que la acumulación de prelamina A es una condición necesaria pero no suficiente para que se vea afectada la adipogénesis, teniendo en cuenta que esta proteína inmadura aparece tanto en lipomas lipodistróficos como en áreas lipohipertróficas (cuello) en una paciente con FPLD2.

Por otro lado, en nuestros estudios con Western Blot, encontramos diferentes patrones de solubilidad de la lamina A en el estudio de las muestras de grasa, siendo lo más notable la menor solubilidad de la lamina A en las muestras (lipoma y peri-limosa) procedentes de uno de los pacientes con la mutación R482W. Previamente, Vigouroux y colaboradores habían encontrado un incremento en la solubilidad de la lamina A en fibroblastos R482W [461], pero estos hallazgos no fueron evaluados en adipocitos. Es posible que estas diferencias sean específicas de acuerdo al tipo de célula, lo cual sería coherente con la sensibilidad tejido-específica de las enfermedades ligadas a mutaciones en LMNA que se producen en humanos.

La interpretación de estos hallazgos no es obvia. Sabemos que la principal función de la lámina nuclear es mantener la estructura de la envoltura nuclear, y que las laminas proporcionan soporte estructural a la interfase de la envoltura nuclear y juegan un papel en su desensamblaje y re-ensamblaje durante la mitosis, procesos éstos estrechamente relacionados con la solubilidad de estas proteínas. Además, se ha visto que la lamina A es más soluble durante la mitosis [520], por lo que esta baja solubilidad que encontramos y su posible implicación en la patogénesis de la FPLD2 deberá ser objeto de futuros estudios.

### **Papel de las hormonas sexuales en la adipogénesis y su relación con la acumulación de prelamina A farnesilada.**

Los mecanismos responsables de la pérdida de tejido adiposo en la FPLD2 no se conocen con exactitud, aunque diversos estudios sugieren que la maduración deficiente de la lamina A/C es la responsable del deterioro de la adipogénesis. Como ya ha sido comentado anteriormente, se ha sugerido que la acumulación tóxica de prelamina A farnesilada actuaría secuestrando determinados factores de transcripción críticos en la maduración de los adipocitos [479]

[521]. No obstante, datos recientes de nuestro laboratorio [522] y que se han presentado en este trabajo apuntan a que la acumulación de prelamina A puede ser una condición necesaria, pero no suficiente para conducir a la alteración de la adipogénesis. Hasta la fecha, no existen estudios que expliquen por qué las mujeres, a diferencia de los hombres, manifiestan dicho fenotipo lipodistrófico a partir de la pubertad.

En el estudio que realizamos con preadipocitos 3T3-L1 observamos una disminución de la expresión de LMNA en las células que fueron inducidas a la diferenciación, determinada tanto por el análisis del ARNm como de las proteínas lamina A/C mediante WB. Cuando indujimos la diferenciación en fibroblastos humanos (ver en Resultados sección 4.4.2) observamos que con la presencia de la pioglitazona en el coctel de diferenciación también disminuía la expresión de LMNA. Por su parte, Boguslavsky y colaboradores, en 2006, describieron que la sobre-expresión de la lamina A, reducía la expresión de PPAR $\gamma$ 2 e inhibía la diferenciación en preadipocitos 3T3-L1 [480]. Estos datos sugieren que la inducción de PPAR $\gamma$ 2 y la expresión de LMNA tienen efectos mutuamente antagónicos.

En las células tratadas con el coctel de diferenciación sin pioglitazona no observamos reducción de la expresión de LMNA, aunque, tampoco se observó un incremento notable en la expresión de los principales adipogenes, excepto en CEBPA, ni cambios relevantes en el fenotipo microscópico (acumulación de gotas de lípidos).

Con el fin de evaluar el efecto de las hormonas sexuales sobre la diferenciación adipocitaria en células que acumulan prelamina A diseñamos un modelo farmacológico al efecto. Para ello tratamos *in vitro* a preadipocitos murinos 3T3-L1 con dos fármacos que alteran el proceso de maduración de la lamina A, el FTI y el AFCMe. El FTI es un inhibidor de la farnesil-transferasa, por lo que al bloquear la farnesilación de la prelamina A impide el correcto procesamiento de la misma por FACE1 dando lugar a la acumulación de prelamina A no farnesilada. Por su parte, el AFCMe es un inhibidor de la metilación del residuo cisteína del motivo CAAX de la prelamina A, impidiendo el segundo corte de la prelamina A farnesilada por la metaloproteasa FACE1, dando lugar a una acumulación de prelamina A farnesilada.

Dado que los anticuerpos anti-prelamina A que disponíamos eran poco específicos para las proteínas murinas y funcionaban mal en Western Blot, comprobamos la eficacia del tratamiento con estos fármacos en preadipocitos humanos mediante inmunofluorescencia. Como puede comprobarse en las figuras 4.59 A y B (en RESULTADOS), tanto el tratamiento con FTI como con AFCMe indujo una movilización de la prelamina A desde el citoplasma

(probablemente desde el retículo endoplasmático) hasta el núcleo, sobre todo en la membrana nuclear. Se observó entonces, una mayor intensidad en la tinción de la prelamina A no farnesilada en las células tratadas con FTI, y una mayor intensidad de la señal de la prelamina A farnesilada en las células tratadas con AFCMe.

En los estudios llevados a cabo en preadipocitos murinos tratados con estos fármacos pudimos comprobar, mediante Western Blot, que se produjo acumulación de prelamina A con el tratamiento del inhibidor FTI. Sin embargo, en las muestras tratadas con AFCMe no se detectó la prelamina A, probablemente porque las cantidades acumuladas de esta proteína inmadura fueron muy pequeñas para el nivel de detección de esta técnica (véanse las diferencias en la intensidad de la inmunofluorescencia en la Figura 4.60 de RESULTADOS).

En las células tratadas con estradiol, aunque no hubo cambios evidentes en la acumulación de gotas de lípidos, aumentó la expresión de los principales genes implicados en el proceso de diferenciación y maduración de adipocitos, así como en los marcadores de adipocito maduro (LPL y GLUT4).

En estudios previos se ha descrito que los estrógenos modulan la proliferación de los preadipocitos [523] [524]. El tratamiento de preadipocitos de ratón (cultivo primario) tratados con hormonas sexuales, demostró que los andrógenos tienen un efecto antiadipogénico, mientras que los estrógenos se comportaban como hormonas proadipogénicas, ejerciendo una regulación positiva sobre PPAR $\gamma$ 2 [523].

En otro estudio *in vitro* con preadipocitos humanos se demostró que el 17-beta estradiol (E2), entre  $10^{-7}$  -  $10^{-9}$  M, es capaz de modular (proporcionalmente a la dosis) la proliferación de estas células con un patrón que es específico del sexo y la localización anatómica. Así, en los preadipocitos procedentes de mujeres tratados con E2 se produjo una mayor respuesta proliferativa que en aquellas células procedentes de individuos del sexo masculino. Por otro lado, el tratamiento con E2 ( $10^{-7}$  M) produjo un incremento más rápido de la proliferación en preadipocitos del TAsc, comparado con los preadipocitos del TA omental, en ambos sexos [524]. Estos hallazgos demuestran que la concentración local de E2 en el tejido adiposo podría representar un potencial mecanismo en los preadipocitos humanos para la regulación de la acumulación regional del tejido adiposo, mediante la modulación de la tasa de proliferación de los mismos [524]. Previamente, estos autores habían estudiado el papel de la concentración de E2 sobre la expresión de los receptores de estrógenos (ER) y describieron



que E2 puede regular diferencialmente la expresión proteica de ER $\alpha$  y ER $\beta$  (dependiendo de la dosis) en preadipocitos humanos del TAsc y del TA omental [525].

Un estudio *in vivo* e *in vitro* sobre el metabolismo del tejido adiposo humano reveló que el estradiol atenúa la respuesta lipolítica a la epinefrina, provocando un incremento del número de receptores antilipolíticos 2 $\alpha$ -adrenérgicos en adipocitos de TAsc; sin embargo, no se observó este efecto del estradiol sobre los adipocitos del TA visceral. Estos resultados sugieren que los estrógenos podrían ayudar a mantener la típica distribución femenina de la grasa subcutánea inhibiendo la lipólisis solamente en el TAsc, favoreciendo así la acumulación de grasa en estos depósitos a expensas de los depósitos viscerales [526].

Todos estos hallazgos apuntan a un importante papel proadipogénico de los estrógenos, y específicamente del 17-beta estradiol, tanto a nivel local como en la regulación de la distribución de la grasa corporal en su conjunto.

En nuestro estudio, el tratamiento combinado de 17 $\beta$ -estradiol y AFCMe condujo a una reducción en la expresión de los principales factores de transcripción y marcadores de maduración de adipocito, determinada como expresión relativa de ARNm, por RT-PCR en tiempo real. En el caso de PPAR $\gamma$  y GLUT4 también se observó una reducción de la expresión proteica, determinada por Western Blot. Sin embargo, estos resultados no se observaron en las células que acumularon prelamina A no farnesilada.

Este resultado pone de manifiesto, al menos *in vitro*, que la acumulación nuclear de la prelamina A farnesilada ejerce sus efectos deletéreos sobre la adipogénesis en presencia de estrógenos. Efectos que son coherentes con las manifestaciones clínicas observadas en las mujeres con lipodistrofia parcial familiar tipo 2, patología que se ha visto asociada con la acumulación de prelamina A farnesilada [479]. Estas pacientes presentan acumulación de grasa en áreas no dependientes de las hormonas sexuales (como el cuello y la cara), y pérdida de la misma en áreas hormono-dependientes (como extremidades, caderas y glúteos). Caron y colaboradores demostraron (de modo indirecto) que la acumulación de prelamina A farnesilada en fibroblastos procedentes de pacientes FPLD con mutaciones en *LMNA* o adipocitos tratados con inhibidores de proteasas genera un incremento del estrés oxidativo y desencadena una senescencia celular prematura [479].

El papel deletéreo de la acumulación de la prelamina A farnesilada sobre la adipogénesis se ha observado fundamentalmente en modelos de envejecimiento prematuro, tanto humanos como murinos [355] [374].

Otros estudios, por su parte, demuestran que son necesarios niveles adecuados de prelamina A farnesilada para la actividad normal del núcleo, al menos, en adipocitos y mioblastos [239] [527]. No obstante, un incremento de la prelamina A farnesilada tiene efectos nocivos como pérdida de dominios de heterocromatina, aumento del tamaño de los núcleos y engrosamiento de la lámina nuclear [482] [528]. Lattanzi y colaboradores demostraron que la prelamina A se une tanto a la proteína asociada a la cromatina (HP1) como a LAP2a in vivo, sin embargo la prelamina A farnesilada tiene una menor afinidad por HP1, estos resultados indican que la estabilidad del complejo prelamina A- LAP2a- HP1 podría estar regulada por la farnesilación de la prelamina A [528].

También se han podido identificar invaginaciones en la envoltura nuclear, tanto en células que acumulan prelamina A farnesilada farmacológicamente por tratamiento con AFCMe [482] como en fibroblastos HGPS o MADA [397] [398]. Así mismo, el engrosamiento de la lámina nuclear provocado por la acumulación de prelamina A farnesilada en células con laminopatías se ha visto particularmente representado en núcleos de fibroblastos HGPS [397] y MADA [398]. Aunque, también en nuestros estudios ultraestructurales de adipocitos FPLD2 encontramos un notable engrosamiento de la lamina nuclear [514] que podría estar asociado a la acumulación de prelamina A farnesilada.

Dicho esto, lo que resulta obvio es que en las mujeres con lipodistrofia parcial familiar debido a mutaciones en *LMNA* (FPLD2) se manifiesta un fenotipo alterado en la distribución de la grasa corporal (con tendencia a un patrón androide), justo después de la pubertad, que posteriormente se asocia con alteraciones metabólicas y cardiovasculares. De modo similar, las mujeres sanas después de la menopausia sufren una redistribución de la grasa corporal (también con tendencia a un patrón androide) que se acompaña de varios componentes del síndrome metabólico. Además, se ha visto que tanto el estatus menopáusico como el envejecimiento en mujeres sanas están asociados con cambios en el metabolismo del TAsc en los depósitos abdominales y glúteos [529]. Todos estos datos sugieren que las hormonas sexuales deben jugar un papel determinante en estos procesos.

A nivel molecular, existen evidencias de que en el tejido adiposo de estas pacientes se produce acumulación de la prelamina A farnesilada [479].

Por otra parte, en el caso de las mujeres postmenopáusicas, el tejido adiposo constituye el principal sitio de biosíntesis de estrógenos. La aromatasa P450 que se expresa en los fibroblastos que componen el tejido adiposo es responsable de la conversión catalítica de esteroides a estrógenos. Se ha visto que la expresión de esta enzima en el tejido adiposo (biopsias de abdomen, caderas y muslos) procedente de mujeres aumenta con la edad, y que dicha expresión es notablemente mayor en las caderas respecto al abdomen [71].

Por otra parte, un estudio reciente ha revelado que alteraciones en el procesamiento de la prelamina A normal están implicadas en el envejecimiento del sistema vascular, en ausencia de progerina. Así, se vió que la prelamina A se acumulaba en células del músculo liso vascular en individuos viejos, y no en individuos jóvenes [530]. En este caso la acumulación de prelamina A es el resultado de una disminución en los niveles de ZMPSTE24, metaloproteasa con una función crítica en el procesamiento de la prelamina, lo cual sugiere que se produce un declive dependiente de la edad en la actividad de esta enzima.

La idea de que el procesamiento post-traducción normal de la prelamina A es un sistema de vital importancia para la célula se apoya en estudios celulares que demuestran cómo las alteraciones en la cinética de maduración de la prelamina A pueden provocar un fenotipo de envejecimiento acelerado en las células [531]; este concepto también ha sido avalado por estudios realizados en animales [532]. Dichos estudios apuntan a la farnesilación permanente de la cola carboxi-terminal de la prelamina A como la fracción tóxica, lo cual es coherente con los estudios que demuestran que la expresión ectópica de variantes de prelamina A (constitutivamente farnesilada) provoca la formación de agregados de la lamina A y una morfología alterada de la membrana nuclear, así como, crecimiento celular severamente limitado, de modo similar a los efectos de la progerina [533] [534].

A partir de todos estos hallazgos, en su conjunto, podríamos decir que el papel de los estrógenos, y particularmente del 17 beta-estradiol, en la regulación de la distribución de la grasa corporal (especialmente en las mujeres) es sumamente importante y complejo. Y que la acumulación de prelamina A farnesilada, ya sea por mutaciones en *LMNA* en las pacientes FPLD2, o por una disminución de la actividad enzimática de ZMPSTE24 en las mujeres sanas postmenopáusicas y con edad avanzada, estaría interfiriendo ese papel modulador del 17 beta-

estradiol que sostiene un patrón ginoide de la de distribución de la grasa corporal en las mujeres sanas premenopáusicas.

**Recuperación de la expresión de genes relacionados con la adipogénesis y el metabolismo de la glucosa en fibroblastos humanos de un paciente BSCL2 inducidos a la diferenciación adipocitaria.**

Como parte de nuestro estudio en la búsqueda de los mecanismos moleculares de las lipodistrofias familiares, contamos con un cultivo primario de fibroblastos de un paciente con otra forma de lipodistrofia familiar más severa, la lipodistrofia congénita generalizada de Berardinelli-Seip tipo 2 (por mutación en el gen *BSCL2*).

En los cultivos primarios de fibroblastos de nuestro paciente BSCL2 la expresión de algunos de los genes involucrados en la adipogénesis fue notablemente menor respecto al control (en particular *LPL*, *LEP* y *SLC2A4* (GLUT4)), tanto antes como después de inducir diferenciación de adipocitos. Este hallazgo resulta coherente con lo descrito por Payne y colaboradores quienes encontraron que la expresión de LPL y GLUT4 estaba significativamente reducida en una línea celular de células madre pluripotentes deficientes en BSCL2, inducidas a adipogénesis [300].

También encontramos que la expresión de *PPARG* en los fibroblastos del paciente lipodistrófico fue similar a ésta en los fibroblastos del sujeto control, sin embargo la expresión de la proteína codificada, detectada por Western blot, fue menor en los fibroblastos del paciente. El grupo de Payne no encontró diferencias en la expresión basal del ARNm de *PPARγ* en células madre mesenquimales (MSCs) deficientes en seipina [300], como tampoco Chen y colaboradores encontraron diferencias en la expresión basal de *PPARG* en células 3T3-L1 con el gen *BSCL2* silenciado [301].

Resulta sorprendente que FABP4 (*aP2*), un marcador de adipocitos maduros, presente una expresión elevada en células lipodistróficas, sobre todo después del tratamiento con el coctel de diferenciación. De hecho, los grupos de Payne y Chen encontraron que la expresión del ARNm de *aP2* está significativamente reducida en MSCs y preadipocitos 3T3-L1, respectivamente, deficientes de *BSCL2*, que fueron tratadas con el coctel de diferenciación [300] [301].

El aP2 (Adipocyte-fatty-acid binding protein 4) se expresa en adipocitos y macrófagos, y está fundamentalmente regulada por agonistas de *PPARγ*, insulina y ácidos grasos. Como se muestra en la Figura 4.64 de RESULTADOS, nuestros resultados al respecto son bastante

robustos, y además, coherentes con otros estudios en los que se ha visto que el déficit de aP2 protege a los ratones contra el desarrollo de resistencia a la insulina asociada con obesidad genética o inducida por la dieta [535] [536].

La inducción de la diferenciación aumentó la expresión de los adipogenes en fibroblastos lipodistróficos, pero no a un nivel comparable con las células controles. Esta respuesta se hizo más evidente cuando se añadió pioglitazona al medio de diferenciación. Estudios recientes han descrito el incremento de la expresión de *BSCL2* durante la adipogénesis inducida con el coctel de diferenciación estándar en presencia o no de glitazonas [300] [301], partiendo de otros tipos de células. En el estudio realizado por Payne y colaboradores no se encontró un incremento tan notable en la expresión de LPL y FABP4 en células madre pluripotentes C3H10T1/ 2 con el gen *BSCL2* silenciado [300]. Por su parte, Chen y colaboradores encontraron una recuperación de la diferenciación, bloqueada en células 3T3-L1 con el gen *BSCL2* silenciado, cuando añaden pioglitazona al coctel estándar, durante los primeros estadios de la diferenciación [301].

Algunas diferencias en los resultados de estudios previos respecto a los nuestros se pueden atribuir al tipo de célula utilizada, y, de hecho, los fibroblastos utilizados en nuestro estudio no llegaron a diferenciarse en adipocitos.

Reconocemos que los fibroblastos dérmicos no son un modelo ideal para estudiar la adipogénesis, pero resulta muy difícil obtener preadipocitos primarios de un individuo con BSCL. Además, nuestros resultados en estas células (procedentes de dos localizaciones diferentes del cuerpo) son coherentes con los escasos estudios publicados anteriormente. Por otra parte, en estudios aun no publicados llevados a cabo en nuestro laboratorio en preadipocitos primarios humanos, no hemos podido reproducir los resultados publicados por Payne y Chen sobre el incremento de expresión del gen *BSCL2* durante el proceso de diferenciación adipocitaria.

El análisis integral de nuestros resultados y aquellos de estudios previos sugiere que las mutaciones en seipina que causan el síndrome de Berardinelli–Seip alteran el proceso de diferenciación de adipocitos reduciendo la expresión del gen *PPARG* y consecuentemente la de sus genes diana.

Nuestros datos muestran que la pioglitazona reduce la expresión del gen *LMNA* en todas las células estudiadas. Como se ha comentado, la sobre-expresión de lamina A reduce la expresión de *PPARG* e inhibe la diferenciación de los adipositos [480]. Por lo que nuestros

resultados sugieren que la activación farmacológica de PPARG tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre el gen *LMNA*.

De modo inesperado encontramos que los fibroblastos de nuestro paciente presentaban una acumulación de prelamina A farnesilada. La relevancia que tiene desde el punto de vista patogénico la acumulación de prelamina A está, como se ha comentado anteriormente, en su unión inhibitoria al factor de transcripción adipocitario SREBP1, que a su vez reduce la actividad de PPAR $\gamma$  y la diferenciación de los adipocitos. Este hallazgo sobre la acumulación de la prelamina A en un porcentaje de las células BSCL2 es sorprendente debido a que hasta el momento no se había descrito un vínculo funcional entre los genes *BSCL* y *LMNA*.

Con el objetivo de dilucidar los posibles mecanismos que podrían explicar este hallazgo, se cuantificó la expresión de *ZMPSTE24* en estas células. *ZMPSTE24* (FACE1) es una metaloproteasa de membrana que juega un papel fundamental en la maduración de la lamina A [148]. Nuestros resultados indicaron que la expresión de esta proteína no está reducida en los fibroblastos Berardinelli–Seip, por lo que la acumulación de prelamina A en estas células no parece ser causada por una escasa expresión de *ZMPSTE24*.

Sin embargo, no podemos descartar una disminución de la actividad de *ZMPSTE24* en las células BSCL2, por ejemplo, debido a una interacción defectuosa de *ZMPSTE24* con la membrana del retículo endoplasmático. De cualquier modo, nuestros datos sugieren que existe un vínculo entre el mecanismo patogénico de la lipodistrofia asociada a *LMNA* y la asociada a *BSCL2*.

## **CONCLUSIONES**





## 6. CONCLUSIONES

1. En nuestra experiencia, la lipodistrofia parcial familiar (FPLD) es el tipo de lipodistrofia más frecuente entre los síndromes lipodistróficos no relacionados con la infección por el VIH.
2. En la mayoría de las pacientes con sospecha clínica de FPLD no se encontraron mutaciones patógenas en los genes *LMNA* y *PPARG*.
3. Aquellas pacientes con mutaciones patógenas en *LMNA* o en *PPARG* presentaron un fenotipo lipodistrófico más acusado, siendo más frecuentes las mutaciones en *LMNA*. En particular, las pacientes portadoras de mutaciones en el codón 482 de *LMNA* fueron las que sufrieron una pérdida de tejido adiposo más importante, asociada a otras manifestaciones que orientan al diagnóstico como la hipertrofia muscular, la acantosis nigricans, la hiperinsulinemia y la hipoleptinemia. El resto de las pacientes con mutaciones en *LMNA* o *PPARG* mostraron una pérdida de grasa menos severa, conservando el tejido adiposo subcutáneo abdominal. No hemos encontrado una asociación entre la severidad de la lipodistrofia parcial y la presencia de alteraciones en el metabolismo lipídico ni hidrocarbonado.
4. Las pacientes sin diagnóstico molecular, clasificadas como lipodistrofia parcial familiar tipo 1 o síndrome de Köberling, presentaron mayor porcentaje de grasa que las diagnosticadas de FPLD2 o FPLD3, y la pérdida de tejido adiposo afectó fundamentalmente a las nalgas y extremidades inferiores. En estas pacientes, la prevalencia de los componentes del síndrome metabólico fue mayor que en aquellas con diagnóstico genético. Nuestro estudio no ha permitido dilucidar si este grupo de pacientes constituye una entidad monogénica en si misma debido a mutaciones puntuales en otros genes desconocidos hasta la fecha o si este particular fenotipo es consecuencia de la combinación de diferentes alteraciones genéticas aun no identificadas.
5. Hemos encontrado una mayor prevalencia de determinados SNPs sinónimos en el gen *LMNA* entre las pacientes con sospecha de FPLD. Estos resultados deben ser tomados con cautela dado el reducido tamaño de la población estudiada. Si la presencia de estos SNPs es consecuencia de un desequilibrio de ligamiento o tiene consecuencias

patogenéticas sobre la distribución de la grasa corporal es algo que se aparta de los objetivos de este trabajo y que deberá ser abordado en futuros estudios.

6. Hemos identificado 5 mutaciones de sentido equivocado no descritas, tres en el gen *LMNA* y otras 2 en el gen *PPARG*. Una sexta mutación, T528M, en el gen *LMNA* ya había sido descrita anteriormente, pero en heterozigosis compuesta y relacionada, bien con FPLD2 o con un síndrome progeroide. En el pedigrí estudiado por nosotros no hemos encontrado otras mutaciones potencialmente patógenas en los genes secuenciados. Estos hallazgos ponen de manifiesto, una vez más, la variable expresividad de las mutaciones en *LMNA*, sugiriendo la probable participación de otras moléculas en la patogenia de la FPLD2.
7. Una de las mutaciones en *LMNA*, C591F, se asoció con miocardiopatía hipertrófica y estenosis aórtica grave además de un cuadro de FPLD2 atípico. En estudios *in vitro* demostramos que esta mutación da lugar a una distribución nuclear anormal de la lamina A y a una acumulación de prelamina A en la membrana del núcleo.
8. La nueva mutación en *LMNA*, I299V, se asoció con un cuadro de FPLD atípico (con una importante acumulación de grasa subcutánea en el abdomen), hipoleptinemia, hipertrigliceridemia, importante resistencia a la insulina y diabetes mellitus de difícil control.
9. Las nuevas mutaciones en *PPARG* (R181Q y S410R) se asociaron con cuadros de lipodistrofia parcial atípica, con pérdida de grasa en extremidades y nalgas, pero acumulación de la misma en cara y abdomen.
10. Los estudios histológicos de las biopsias de tejido adiposo de pacientes con FPLD2 pusieron de manifiesto que la morfología del mismo era muy semejante al tejido adiposo blanco normal, con la salvedad de que los adipocitos fueron algo más grandes. También se observó la presencia de infiltrados de macrófagos y linfocitos T característicos de la inflamación crónica de bajo grado propia de la obesidad.
11. La presencia de lipomas, incluso en áreas lipoatróficas, es una característica clínica de la FPLD2 que no ha sido suficientemente documentada hasta la fecha y que constatamos en nuestro estudio. Las características histológicas de estos lipomas fue semejante a la del tejido adiposo no lipomatoso colindante.
12. Los estudios ultraestructurales de las muestras de tejido adiposo de pacientes lipodistróficos pusieron de manifiesto anormalidades en la distribución de la

heterocromatina y el engrosamiento de la lámina nuclear en los distintos tipos de células que constituyen estos tejidos.

13. En este estudio se evidenció, por primera vez *ex vivo*, la acumulación de prelamina A en los adipocitos de los pacientes con FPLD2. El hecho de que la acumulación de esta forma inmadura de la proteína se haya detectado también en el tejido adiposo de áreas lipohipertróficas (cuello y lipomas) sugiere que la acumulación de prelamina A podría ser una condición necesaria pero no suficiente en la patogenia de la pérdida de grasa en este tipo de lipodistrofia.
14. La cuantificación relativa de la expresión génica llevada a cabo en las muestras de grasa subcutánea de estos pacientes mostró una reducción en la expresión de los principales genes que regulan el ciclo celular, la función mitocondrial y el proceso de diferenciación adipocitario. La expresión de los principales adipogenes estuvo también disminuida en el tejido lipomatoso lipoatrófico.
15. Varias proteínas conocidas por jugar un papel clave en la salida del ciclo celular o en el compromiso para la diferenciación, como pRb, p53, C/EBP $\beta$  y PPAR $\gamma$ , no se expresaron adecuadamente en el TAsc de las pacientes con FPLD2.
16. En estas pacientes encontramos una reducción de la expresión de varios genes implicados en la proliferación/diferenciación de los adipocitos: *RB1*, *CCND1*, *CCND3* (genes relacionados con el ciclo celular), *PPARG2*, *LPL* y *SLC2A4* (GLUT4) (genes involucrados en la adipogénesis).
17. El tratamiento *in vitro* en preadipocitos murinos con concentraciones fisiológicas de estrógenos aumentó la expresión de los principales genes implicados en el proceso de diferenciación y maduración de los adipocitos. Nuestros estudios sugieren que la acumulación de prelamina A farnesilada reduce el efecto proadipogénico de los estrógenos.
18. La expresión de diversos genes relacionados con la diferenciación adipocitaria se mostró severamente comprometida en fibroblastos primarios de un paciente con BSCL2. Dicha expresión fue rescatada parcialmente mediante el tratamiento con pioglitazona.



## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

1. Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW, Soos MA, Maslen GL, Williams TD, Lewis H, Schafer AJ *et al*: Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature* 1999, 402(6764):880-883.
2. Cao H, Hegele RA: Nuclear lamin A/C R482Q mutation in canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 2000, 9(1):109-112.
3. Agarwal AK, Garg A: A novel heterozygous mutation in peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in a patient with familial partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87(1):408-411.
4. George S, Rochford JJ, Wolfrum C, Gray SL, Schinner S, Wilson JC, Soos MA, Murgatroyd PR, Williams RM, Acerini CL *et al*: A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2. *Science* 2004, 304(5675):1325-1328.
5. Kim CA, Delepine M, Boutet E, El Mourabit H, Le Lay S, Meier M, Nemani M, Bridel E, Leite CC, Bertola DR *et al*: Association of a homozygous nonsense caveolin-1 mutation with Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2008, 93(4):1129-1134.
6. Hayashi YK, Matsuda C, Ogawa M, Goto K, Tominaga K, Mitsuhashi S, Park YE, Nonaka I, Hino-Fukuyo N, Haginoya K *et al*: Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. *J Clin Invest* 2009, 119(9):2623-2633.
7. Rubio-Cabezas O, Puri V, Murano I, Saudek V, Semple RK, Dash S, Hyden CS, Bottomley W, Vigouroux C, Magre J *et al*: Partial lipodystrophy and insulin resistant diabetes in a patient with a homozygous nonsense mutation in CIDEC. *EMBO Mol Med* 2009, 1(5):280-287.
8. Magre J, Delepine M, Khallouf E, Gedde-Dahl T, Jr., Van Maldergem L, Sobel E, Papp J, Meier M, Megarbane A, Bachy A *et al*: Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat Genet* 2001, 28(4):365-370.
9. Gandotra S, Le Dour C, Bottomley W, Cervera P, Giral P, Reznik Y, Charpentier G, Auclair M, Delepine M, Barroso I *et al*: Perilipin deficiency and autosomal dominant partial lipodystrophy. *N Engl J Med* 2011, 364(8):740-748.
10. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994, 372(6505):425-432.
11. Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL: Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* 2008, 29(24):2959-2971.
12. Gesta S, Tseng YH, Kahn CR: Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 2007, 131(2):242-256.
13. Billon N, Iannarelli P, Monteiro MC, Glavieux-Pardanaud C, Richardson WD, Kessar N, Dani C, Dupin E: The generation of adipocytes by the neural crest. *Development* 2007, 134(12):2283-2292.
14. Atit R, Sgaier SK, Mohamed OA, Taketo MM, Dufort D, Joyner AL, Niswander L, Conlon RA: Beta-catenin activation is necessary and sufficient to specify the dorsal dermal fate in the mouse. *Dev Biol* 2006, 296(1):164-176.
15. Billon N, Monteiro MC, Dani C: Developmental origin of adipocytes: new insights into a pending question. *Biol Cell* 2008, 100(10):563-575.
16. Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, Nishikawa S: Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* 2007, 129(7):1377-1388.
17. Avram MM, Avram AS, James WD: Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell. *J Am Acad Dermatol* 2007, 56(3):472-492.
18. Enerback S: Human brown adipose tissue. *Cell Metab* 2010, 11(4):248-252.

19. Hauner H, Entenmann G: Regional variation of adipose differentiation in cultured stromal-vascular cells from the abdominal and femoral adipose tissue of obese women. *Int J Obes* 1991, 15(2):121-126.
20. Kirkland JL, Hollenberg CH, Gillon WS: Effects of fat depot site on differentiation-dependent gene expression in rat preadipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1996, 20 Suppl 3:S102-107.
21. Cinti S: The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005, 73(1):9-15.
22. Cannon B, Nedergaard J: Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004, 84(1):277-359.
23. English JT, Patel SK, Flanagan MJ: Association of pheochromocytomas with brown fat tumors. *Radiology* 1973, 107(2):279-281.
24. Huttunen P, Hirvonen J, Kinnula V: The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1981, 46(4):339-345.
25. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B: Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007, 293(2):E444-452.
26. Saito M, Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Watanabe K, Yoneshiro T, Nio-Kobayashi J, Iwanaga T, Miyagawa M, Kameya T, Nakada K *et al*: High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 2009, 58(7):1526-1531.
27. Sethi JK, Vidal-Puig AJ: Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res* 2007, 48(6):1253-1262.
28. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW: Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 2004, 145(5):2273-2282.
29. Waki H, Tontonoz P: Endocrine functions of adipose tissue. *Annu Rev Pathol* 2007, 2:31-56.
30. Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA: The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001, 280(6):E827-847.
31. Frayn KN, Karpe F, Fielding BA, Macdonald IA, Coppack SW: Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003, 27(8):875-888.
32. Ailhaud GH, H: Development of white adipose tissue. In: *Handbook of Obesity: Etiology and Pathophysiology*. Edited by Bray AaB, C, 2nd edn. New York: Marcel Dekker, Inc; 2004: 481-514.
33. Park KW, Halperin DS, Tontonoz P: Before they were fat: adipocyte progenitors. *Cell Metab* 2008, 8(6):454-457.
34. Visser M, Pahor M, Tylavsky F, Kritchevsky SB, Cauley JA, Newman AB, Blunt BA, Harris TB: One- and two-year change in body composition as measured by DXA in a population-based cohort of older men and women. *J Appl Physiol* 2003, 94(6):2368-2374.
35. Raguso CA, Kyle U, Kossovsky MP, Roynette C, Paoloni-Giacobino A, Hans D, Genton L, Pichard C: A 3-year longitudinal study on body composition changes in the elderly: role of physical exercise. *Clin Nutr* 2006, 25(4):573-580.
36. Tchkonja T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scrable H, Khosla S, Jensen MD, Kirkland JL: Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell* 2010, 9(5):667-684.
37. Hughes VA, Roubenoff R, Wood M, Frontera WR, Evans WJ, Fiatarone Singh MA: Anthropometric assessment of 10-y changes in body composition in the elderly. *Am J Clin Nutr* 2004, 80(2):475-482.
38. Koutsari C, Ali AH, Nair KS, Rizza RA, O'Brien P, Khosla S, Jensen MD: Fatty acid metabolism in the elderly: effects of dehydroepiandrosterone and testosterone replacement in hormonally deficient men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2009, 94(9):3414-3423.
39. Garg A, Agarwal AK: Lipodystrophies: disorders of adipose tissue biology. *Biochim Biophys Acta* 2009, 1791(6):507-513.



40. Sepe A, Tchkonja T, Thomou T, Zamboni M, Kirkland JL: Aging and regional differences in fat cell progenitors - a mini-review. *Gerontology* 2011, 57(1):66-75.
41. Ponder CM: An evolutionary and functional view of mammalian adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 1992, 51(3):367-377.
42. Lemieux S, Prud'homme D, Bouchard C, Tremblay A, Despres JP: Sex differences in the relation of visceral adipose tissue accumulation to total body fatness. *Am J Clin Nutr* 1993, 58(4):463-467.
43. Wells JC: Sexual dimorphism of body composition. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007, 21(3):415-430.
44. Siervogel RM, Demerath EW, Schubert C, Remsberg KE, Chumlea WC, Sun S, Czerwinski SA, Towne B: Puberty and body composition. *Horm Res* 2003, 60(Suppl 1):36-45.
45. Van Loan MD: Body fat distribution from subcutaneous to intraabdominal: a perspective. *Am J Clin Nutr* 1996, 64(5):787-788.
46. Shen W, Wang Z, Punyanita M, Lei J, Sinav A, Kral JG, Imielinska C, Ross R, Heymsfield SB: Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification. *Obes Res* 2003, 11(1):5-16.
47. Kissebah AH, Krakower GR: Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev* 1994, 74(4):761-811.
48. Despres JP, Moorjani S, Tremblay A, Ferland M, Lupien PJ, Nadeau A, Bouchard C: Relation of high plasma triglyceride levels associated with obesity and regional adipose tissue distribution to plasma lipoprotein-lipid composition in premenopausal women. *Clin Invest Med* 1989, 12(6):374-380.
49. Despres JP, Lemieux I: Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 2006, 444(7121):881-887.
50. Pasquali R, Casimirri F, Cantobelli S, Melchionda N, Morselli Labate AM, Fabbri R, Capelli M, Bortoluzzi L: Effect of obesity and body fat distribution on sex hormones and insulin in men. *Metabolism* 1991, 40(1):101-104.
51. Khaw KT, Barrett-Connor E: Lower endogenous androgens predict central adiposity in men. *Ann Epidemiol* 1992, 2(5):675-682.
52. Gapstur SM, Gann PH, Kopp P, Colangelo L, Longcope C, Liu K: Serum androgen concentrations in young men: a longitudinal analysis of associations with age, obesity, and race. The CARDIA male hormone study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002, 11(10 Pt 1):1041-1047.
53. Seidell JC, Bjorntorp P, Sjostrom L, Kvist H, Sannerstedt R: Visceral fat accumulation in men is positively associated with insulin, glucose, and C-peptide levels, but negatively with testosterone levels. *Metabolism* 1990, 39(9):897-901.
54. Garaulet M, Perex-Llomas F, Fuente T, Zamora S, Tebar FJ: Anthropometric, computed tomography and fat cell data in an obese population: relationship with insulin, leptin, tumor necrosis factor- $\alpha$ , sex hormone-binding globulin and sex hormones. *Eur J Endocrinol* 2000, 143(5):657-666.
55. Tsai EC, Matsumoto AM, Fujimoto WY, Boyko EJ: Association of bioavailable, free, and total testosterone with insulin resistance: influence of sex hormone-binding globulin and body fat. *Diabetes Care* 2004, 27(4):861-868.
56. Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD, Hauser R: Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril* 2010, 93(7):2222-2231.
57. Tchernof A, Despres JP: Sex steroid hormones, sex hormone-binding globulin, and obesity in men and women. *Horm Metab Res* 2000, 32(11-12):526-536.
58. Dunaif A: Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* 1997, 18(6):774-800.
59. Rosner W, Auchus RJ, Azziz R, Sluss PM, Raff H: Position statement: Utility, limitations, and pitfalls in measuring testosterone: an Endocrine Society position statement. *J Clin Endocrinol Metab* 2007, 92(2):405-413.

60. Kotani K, Tokunaga K, Fujioka S, Kobatake T, Keno Y, Yoshida S, Shimomura I, Tarui S, Matsuzawa Y: Sexual dimorphism of age-related changes in whole-body fat distribution in the obese. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1994, 18(4):207-202.
61. Haarbo J, Marslew U, Gotfredsen A, Christiansen C: Postmenopausal hormone replacement therapy prevents central distribution of body fat after menopause. *Metabolism* 1991, 40(12):1323-1326.
62. Tchernof A, Poehlman ET: Effects of the menopause transition on body fatness and body fat distribution. *Obes Res* 1998, 6(3):246-254.
63. Casey MM, PC, Simpson ER: Endocrinological changes of pregnancy. In: *Williams' Textbook of Endocrinology*. Edited by Foster DW WJ. Philadelphia, PA: W. B. Saunders; 1992: 977-992.
64. Ackerman GE, Smith ME, Mendelson CR, MacDonald PC, Simpson ER: Aromatization of androstenedione by human adipose tissue stromal cells in monolayer culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1981, 53(2):412-417.
65. Grodin JM, Siiteri PK, MacDonald PC: Source of estrogen production in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1973, 36(2):207-214.
66. MacDonald P: Origin of estrogen in postmenopausal women at increased risk of endometrial carcinoma. In: *Hormonal Biology of Endometrial Cancer* Edited by Richardson GS MD. Geneva, Switzerland U.I.C.C. Technical Report Series 1978 15-35.
67. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD *et al*: Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 1994, 15(3):342-355.
68. MacDonald PC, Madden JD, Brenner PF, Wilson JD, Siiteri PK: Origin of estrogen in normal men and in women with testicular feminization. *J Clin Endocrinol Metab* 1979, 49(6):905-916.
69. Siiteri PM, PC Role of extraglandular estrogen in human endocrinology. In: *Handbook of Physiology*. Edited by Greep RO AE, vol. 2. Washington, DC: American Physiological Society; 1973 619-629.
70. Hemsell DL, Grodin JM, Brenner PF, Siiteri PK, MacDonald PC: Plasma precursors of estrogen. II. Correlation of the extent of conversion of plasma androstenedione to estrone with age. *J Clin Endocrinol Metab* 1974, 38(3):476-479.
71. Bulun SE, Simpson ER: Competitive reverse transcription-polymerase chain reaction analysis indicates that levels of aromatase cytochrome P450 transcripts in adipose tissue of buttocks, thighs, and abdomen of women increase with advancing age. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 78(2):428-432.
72. Meseguer A, Puche C, Cabero A: Sex steroid biosynthesis in white adipose tissue. *Horm Metab Res* 2002, 34(11-12):731-736.
73. Belanger C, Luu-The V, Dupont P, Tchernof A: Adipose tissue intracrinology: potential importance of local androgen/estrogen metabolism in the regulation of adiposity. *Horm Metab Res* 2002, 34(11-12):737-745.
74. Pasquali R, Vicennati V, Gambineri A, Pagotto U: Sex-dependent role of glucocorticoids and androgens in the pathophysiology of human obesity. *Int J Obes (Lond)* 2008, 32(12):1764-1779.
75. Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS: A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 2001, 294(5549):2166-2170.
76. Bujalska IJ, Walker EA, Hewison M, Stewart PM: A switch in dehydrogenase to reductase activity of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 upon differentiation of human omental adipose stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87(3):1205-1210.
77. Walker BR, Andrew R: Tissue production of cortisol by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and metabolic disease. *Ann NY Acad Sci* 2006, 1083:165-184.
78. Bujalska IJ, Kumar S, Stewart PM: Does central obesity reflect "Cushing's disease of the omentum"? *Lancet* 1997, 349(9060):1210-1213.

79. Tomlinson JW, Sinha B, Bujalska I, Hewison M, Stewart PM: Expression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in adipose tissue is not increased in human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87(12):5630-5635.
80. Fried SK, Russell CD, Grauso NL, Brolin RE: Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men. *J Clin Invest* 1993, 92(5):2191-2198.
81. Rosen ED, MacDougald OA: Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, 7(12):885-896.
82. Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, Hamilton DL, Gimeno RE, Wahlestedt C, Baar K *et al*: Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104(11):4401-4406.
83. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scime A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H *et al*: PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 2008, 454(7207):961-967.
84. Schulz TJ, Huang TL, Tran TT, Zhang H, Townsend KL, Shadrach JL, Cerletti M, McDougall LE, Giorgadze N, Tchkonja T *et al*: Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, 108(1):143-148.
85. Ashwell M, Jennings G, Richard D, Stirling DM, Trayhurn P: Effect of acclimation temperature on the concentration of the mitochondrial 'uncoupling' protein measured by radioimmunoassay in mouse brown adipose tissue. *FEBS Lett* 1983, 161(1):108-112.
86. Cousin B, Cinti S, Morroni M, Raimbault S, Ricquier D, Penicaud L, Casteilla L: Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci* 1992, 103 ( Pt 4):931-942.
87. Guerra C, Koza RA, Yamashita H, Walsh K, Kozak LP: Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest* 1998, 102(2):412-420.
88. Granneman JG, Li P, Zhu Z, Lu Y: Metabolic and cellular plasticity in white adipose tissue I: effects of beta3-adrenergic receptor activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005, 289(4):E608-616.
89. Himms-Hagen J, Melnyk A, Zingaretti MC, Ceresi E, Barbatelli G, Cinti S: Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000, 279(3):C670-681.
90. Loncar D: Convertible adipose tissue in mice. *Cell Tissue Res* 1991, 266(1):149-161.
91. Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K, Giacobino JP, De Matteis R, Cinti S: The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010, 298(6):E1244-1253.
92. Cinti S: The adipose organ. In: *Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease*. Totowa, NJ: Humana; 2007: 1-17.
93. Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ: The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev* 2001, 2(4):239-254.
94. Gregoire FM: Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001, 226(11):997-1002.
95. Fajas L: Adipogenesis: a cross-talk between cell proliferation and cell differentiation. *Ann Med* 2003, 35(2):79-85.
96. Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R: Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 1992, 12:207-233.
97. Farmer SR: Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* 2006, 4(4):263-273.
98. Smas CM, Sul HS: Control of adipocyte differentiation. *Biochem J* 1995, 309 ( Pt 3):697-710.
99. Morrison RF, Farmer SR: Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Nutr* 2000, 130(12):3116S-3121S.
100. Rosen ED: The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005, 73(1):31-34.

101. Rosen ED, Spiegelman BM: Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000, 16:145-171.
102. Ntambi JM, Young-Cheul K: Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* 2000, 130(12):3122S-3126S.
103. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS: Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* 1998, 78(3):783-809.
104. Wu Z, Xie Y, Morrison RF, Bucher NL, Farmer SR: PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J Clin Invest* 1998, 101(1):22-32.
105. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM: PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 1999, 4(4):611-617.
106. Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM: C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev* 2002, 16(1):22-26.
107. Smas CM, Chen L, Zhao L, Latasa MJ, Sul HS: Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 1999, 274(18):12632-12641.
108. Smas CM, Sul HS: Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* 1993, 73(4):725-734.
109. Wang Y, Sul HS: Pref-1 regulates mesenchymal cell commitment and differentiation through Sox9. *Cell Metab* 2009, 9(3):287-302.
110. Cao Z, Umek RM, McKnight SL: Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 1991, 5(9):1538-1552.
111. Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL: Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev* 1995, 9(2):168-181.
112. Zeng G, Dave JR, Chiang PK: Induction of proto-oncogenes during 3-deazaadenosine-stimulated differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes: mimicry of insulin action. *Oncol Res* 1997, 9(4):205-211.
113. Cornelius P, MacDougald OA, Lane MD: Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr* 1994, 14:99-129.
114. Cobrinik D: Regulatory interactions among E2Fs and cell cycle control proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996, 208:31-61.
115. Dyson N: The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* 1998, 12(15):2245-2262.
116. Nevins JR: Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ* 1998, 9(8):585-593.
117. Nevins JR: E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 1992, 258(5081):424-429.
118. Narita M, Nunez S, Heard E, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW: Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* 2003, 113(6):703-716.
119. Zhang JW, Klemm DJ, Vinson C, Lane MD: Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *J Biol Chem* 2004, 279(6):4471-4478.
120. Tang QQ, Otto TC, Lane MD: CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100(3):850-855.
121. Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S: Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J* 1997, 16(24):7432-7443.
122. Tang QQ, Zhang JW, Daniel Lane M: Sequential gene promoter interactions of C/EBPbeta, C/EBPalpha, and PPARgamma during adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 319(1):235-239.
123. Karagiannides I, Thomou T, Tchkonja T, Pirtskhalava T, Kypreos KE, Cartwright A, Dalagiorgou G, Lash TL, Farmer SR, Timchenko NA *et al*: Increased CUG triplet repeat-

- binding protein-1 predisposes to impaired adipogenesis with aging. *J Biol Chem* 2006, 281(32):23025-23033.
124. Barreau C, Paillard L, Mereau A, Osborne HB: Mammalian CELF/Bruno-like RNA-binding proteins: molecular characteristics and biological functions. *Biochimie* 2006, 88(5):515-525.
125. Vlasova IA, Tahoe NM, Fan D, Larsson O, Rattenbacher B, Sternjohn JR, Vasdevani J, Karypis G, Reilly CS, Bitterman PB *et al*: Conserved GU-rich elements mediate mRNA decay by binding to CUG-binding protein 1. *Mol Cell* 2008, 29(2):263-270.
126. Timchenko NA, Welm AL, Lu X, Timchenko LT: CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPbeta mRNA and regulates translation of C/EBPbeta isoforms. *Nucleic Acids Res* 1999, 27(22):4517-4525.
127. Timchenko LT, Salisbury E, Wang GL, Nguyen H, Albrecht JH, Hershey JW, Timchenko NA: Age-specific CUGBP1-eIF2 complex increases translation of CCAAT/enhancer-binding protein beta in old liver. *J Biol Chem* 2006, 281(43):32806-32819.
128. Zhu Y, Alvares K, Huang Q, Rao MS, Reddy JK: Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. *J Biol Chem* 1993, 268(36):26817-26820.
129. Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM: Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature* 1992, 358(6389):771-774.
130. Tamori Y, Masugi J, Nishino N, Kasuga M: Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 2002, 51(7):2045-2055.
131. Imai T, Takakuwa R, Marchand S, Dentz E, Bornert JM, Messaddeq N, Wendling O, Mark M, Desvergne B, Wahli W *et al*: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(13):4543-4547.
132. Reynolds K, Goldberg RB: Thiazolidinediones : beyond glycemic control. *Treat Endocrinol* 2006, 5(1):25-36.
133. Kim JB, Spiegelman BM: ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* 1996, 10(9):1096-1107.
134. Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM: ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(8):4333-4337.
135. Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, Lowell BB, Spiegelman BM: Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest* 1998, 101(1):1-9.
136. Chen Z, Torrens JI, Anand A, Spiegelman BM, Friedman JM: Krox20 stimulates adipogenesis via C/EBPbeta-dependent and -independent mechanisms. *Cell Metab* 2005, 1(2):93-106.
137. Oishi Y, Manabe I, Tobe K, Tsushima K, Shindo T, Fujiu K, Nishimura G, Maemura K, Yamauchi T, Kubota N *et al*: Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metab* 2005, 1(1):27-39.
138. Bates S, Parry D, Bonetta L, Vousden K, Dickson C, Peters G: Absence of cyclin D/cdk complexes in cells lacking functional retinoblastoma protein. *Oncogene* 1994, 9(6):1633-1640.
139. Kato JY, Matsuoka M, Strom DK, Sherr CJ: Regulation of cyclin D-dependent kinase 4 (cdk4) by cdk4-activating kinase. *Mol Cell Biol* 1994, 14(4):2713-2721.
140. Meyerson M, Harlow E: Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* 1994, 14(3):2077-2086.
141. Sarruf DA, Iankova I, Abella A, Assou S, Miard S, Fajas L: Cyclin D3 promotes adipogenesis through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell Biol* 2005, 25(22):9985-9995.
142. Fu M, Rao M, Bouras T, Wang C, Wu K, Zhang X, Li Z, Yao TP, Pestell RG: Cyclin D1 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated adipogenesis through histone deacetylase recruitment. *J Biol Chem* 2005, 280(17):16934-16941.

143. Elledge RM, Lee WH: Life and death by p53. *Bioessays* 1995, 17(11):923-930.
144. Lane DP: Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992, 358(6381):15-16.
145. Bensaad K, Vousden KH: p53: new roles in metabolism. *Trends Cell Biol* 2007, 17(6):286-291.
146. Hallenborg P, Feddersen S, Madsen L, Kristiansen K: The tumor suppressors pRB and p53 as regulators of adipocyte differentiation and function. *Expert Opin Ther Targets* 2009, 13(2):235-246.
147. Saleem A, Adhietty PJ, Hood DA: Role of p53 in mitochondrial biogenesis and apoptosis in skeletal muscle. *Physiol Genomics* 2009, 37(1):58-66.
148. Broers JL, Ramaekers FC, Bonne G, Yaou RB, Hutchison CJ: Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev* 2006, 86(3):967-1008.
149. Worman HJ, Ostlund C, Wang Y: Diseases of the nuclear envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010, 2(2):a000760.
150. Goldberg M: Import and export at the nuclear envelope. *Symp Soc Exp Biol* 2004(56):115-133.
151. Garg A: Acquired and inherited lipodystrophies. *N Engl J Med* 2004, 350(12):1220-1234.
152. Schirmer EC, Florens L, Guan T, Yates JR, 3rd, Gerace L: Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics. *Science* 2003, 301(5638):1380-1382.
153. Schirmer EC, Gerace L: The nuclear membrane proteome: extending the envelope. *Trends Biochem Sci* 2005, 30(10):551-558.
154. Schirmer EC, Foisner R: Proteins that associate with lamins: many faces, many functions. *Exp Cell Res* 2007, 313(10):2167-2179.
155. Goldberg M, Harel A, Brandeis M, Rechsteiner T, Richmond TJ, Weiss AM, Gruenbaum Y: The tail domain of lamin Dm0 binds histones H2A and H2B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96(6):2852-2857.
156. Gotzmann J, Foisner R: Lamins and lamin-binding proteins in functional chromatin organization. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1999, 9(3-4):257-265.
157. Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K: Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 2001, 114(Pt 24):4557-4565.
158. Gruenbaum Y, Goldman RD, Meyuhas R, Mills E, Margalit A, Fridkin A, Dayani Y, Prokocimer M, Enosh A: The nuclear lamina and its functions in the nucleus. *Int Rev Cytol* 2003, 226:1-62.
159. Mattout A, Dechat T, Adam SA, Goldman RD, Gruenbaum Y: Nuclear lamins, diseases and aging. *Curr Opin Cell Biol* 2006, 18(3):335-341.
160. Terry LJ, Shows EB, Wentz SR: Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science* 2007, 318(5855):1412-1416.
161. Dworetzky SI, Feldherr CM: Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes. *J Cell Biol* 1988, 106(3):575-584.
162. Alberts B JA, Lewis J, et al. : The Transport of Molecules between the Nucleus and the Cytosol. In: *Molecular Biology of the Cell*. 4th edn. New York: Garland Science; 2002.
163. Rout MP, Aitchison JD, Suprpto A, Hjertaas K, Zhao Y, Chait BT: The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* 2000, 148(4):635-651.
164. Cronshaw JM, Krutchinsky AN, Zhang W, Chait BT, Matunis MJ: Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol* 2002, 158(5):915-927.
165. Tran EJ, Wentz SR: Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell* 2006, 125(6):1041-1053.
166. Lyman SK, Gerace L: Nuclear pore complexes: dynamics in unexpected places. *J Cell Biol* 2001, 154(1):17-20.
167. Senior A, Gerace L: Integral membrane proteins specific to the inner nuclear membrane and associated with the nuclear lamina. *J Cell Biol* 1988, 107(6 Pt 1):2029-2036.
168. Worman HJ, Yuan J, Blobel G, Georgatos SD: A lamin B receptor in the nuclear envelope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, 85(22):8531-8534.

169. Harris CA, Andryuk PJ, Cline SW, Mathew S, Siekierka JJ, Goldstein G: Structure and mapping of the human thymopoietin (TMPO) gene and relationship of human TMPO beta to rat lamin-associated polypeptide 2. *Genomics* 1995, 28(2):198-205.
170. Dechat T, Vlcek S, Foisner R: Review: lamina-associated polypeptide 2 isoforms and related proteins in cell cycle-dependent nuclear structure dynamics. *J Struct Biol* 2000, 129(2-3):335-345.
171. Dechat T, Korbei B, Vaughan OA, Vlcek S, Hutchison CJ, Foisner R: Lamina-associated polypeptide 2alpha binds intranuclear A-type lamins. *J Cell Sci* 2000, 113 Pt 19:3473-3484.
172. Bione S, Maestrini E, Rivella S, Mancini M, Regis S, Romeo G, Toniolo D: Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 1994, 8(4):323-327.
173. Manilal S, Nguyen TM, Sewry CA, Morris GE: The Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein, emerin, is a nuclear membrane protein. *Hum Mol Genet* 1996, 5(6):801-808.
174. Nagano A, Koga R, Ogawa M, Kurano Y, Kawada J, Okada R, Hayashi YK, Tsukahara T, Arahata K: Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 1996, 12(3):254-259.
175. Ellis DJ, Jenkins H, Whitfield WG, Hutchison CJ: GST-lamin fusion proteins act as dominant negative mutants in *Xenopus* egg extract and reveal the function of the lamina in DNA replication. *J Cell Sci* 1997, 110 ( Pt 20):2507-2518.
176. Vaughan A, Alvarez-Reyes M, Bridger JM, Broers JL, Ramaekers FC, Wehnert M, Morris GE, Whitfield WGF, Hutchison CJ: Both emerin and lamin C depend on lamin A for localization at the nuclear envelope. *J Cell Sci* 2001, 114(Pt 14):2577-2590.
177. Gareiss M, Eberhardt K, Kruger E, Kandert S, Bohm C, Zentgraf H, Muller CR, Dabauvalle MC: Emerin expression in early development of *Xenopus laevis*. *Eur J Cell Biol* 2005, 84(2-3):295-309.
178. Lin F, Blake DL, Callebaut I, Skerjanc IS, Holmer L, McBurney MW, Paulin-Levasseur M, Worman HJ: MAN1, an inner nuclear membrane protein that shares the LEM domain with lamina-associated polypeptide 2 and emerin. *J Biol Chem* 2000, 275(7):4840-4847.
179. Starr DA: A nuclear-envelope bridge positions nuclei and moves chromosomes. *J Cell Sci* 2009, 122(Pt 5):577-586.
180. Tzur YB, Wilson KL, Gruenbaum Y: SUN-domain proteins: 'Velcro' that links the nucleoskeleton to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006, 7(10):782-788.
181. Zhang Q, Skepper JN, Yang F, Davies JD, Hegyi L, Roberts RG, Weissberg PL, Ellis JA, Shanahan CM: Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J Cell Sci* 2001, 114(Pt 24):4485-4498.
182. Zhen YY, Libotte T, Munck M, Noegel AA, Korenbaum E: NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 2002, 115(Pt 15):3207-3222.
183. Libotte T, Zaim H, Abraham S, Padmakumar VC, Schneider M, Lu W, Munck M, Hutchison C, Wehnert M, Fahrenkrog B *et al*: Lamin A/C-dependent localization of Nesprin-2, a giant scaffold at the nuclear envelope. *Mol Biol Cell* 2005, 16(7):3411-3424.
184. Mislow JM, Holaska JM, Kim MS, Lee KK, Segura-Totten M, Wilson KL, McNally EM: Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro. *FEBS Lett* 2002, 525(1-3):135-140.
185. Muchir A, van Engelen BG, Lammens M, Mislow JM, McNally E, Schwartz K, Bonne G: Nuclear envelope alterations in fibroblasts from LGMD1B patients carrying nonsense Y259X heterozygous or homozygous mutation in lamin A/C gene. *Exp Cell Res* 2003, 291(2):352-362.
186. Zhang Q, Ragnauth CD, Skepper JN, Worth NF, Warren DT, Roberts RG, Weissberg PL, Ellis JA, Shanahan CM: Nesprin-2 is a multi-isomeric protein that binds lamin and emerin at the nuclear envelope and forms a subcellular network in skeletal muscle. *J Cell Sci* 2005, 118(Pt 4):673-687.
187. Apel ED, Lewis RM, Grady RM, Sanes JR: Syne-1, a dystrophin- and Klarsicht-related protein associated with synaptic nuclei at the neuromuscular junction. *J Biol Chem* 2000, 275(41):31986-31995.

188. Fisher DZ, Chaudhary N, Blobel G: cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986, 83(17):6450-6454.
189. McKeon FD, Kirschner MW, Caput D: Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* 1986, 319(6053):463-468.
190. Stuurman N, Heins S, Aebi U: Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol* 1998, 122(1-2):42-66.
191. Dhe-Paganon S, Werner ED, Chi YI, Shoelson SE: Structure of the globular tail of nuclear lamin. *J Biol Chem* 2002, 277(20):17381-17384.
192. Krimm I, Ostlund C, Gilquin B, Couprie J, Hossenlopp P, Mornon JP, Bonne G, Courvalin JC, Worman HJ, Zinn-Justin S: The Ig-like structure of the C-terminal domain of lamin A/C, mutated in muscular dystrophies, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy. *Structure* 2002, 10(6):811-823.
193. Stierle V, Couprie J, Ostlund C, Krimm I, Zinn-Justin S, Hossenlopp P, Worman HJ, Courvalin JC, Duband-Goulet I: The carboxyl-terminal region common to lamins A and C contains a DNA binding domain. *Biochemistry* 2003, 42(17):4819-4828.
194. Frangioni JV, Neel BG: Use of a general purpose mammalian expression vector for studying intracellular protein targeting: identification of critical residues in the nuclear lamin A/C nuclear localization signal. *J Cell Sci* 1993, 105 ( Pt 2):481-488.
195. Loewinger L, McKeon F: Mutations in the nuclear lamin proteins resulting in their aberrant assembly in the cytoplasm. *EMBO J* 1988, 7(8):2301-2309.
196. Lin F, Worman HJ: Structural organization of the human gene (LMNB1) encoding nuclear lamin B1. *Genomics* 1995, 27(2):230-236.
197. Biamonti G, Giacca M, Perini G, Contreas G, Zentilin L, Weighardt F, Guerra M, Della Valle G, Saccone S, Riva S *et al*: The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Mol Cell Biol* 1992, 12(8):3499-3506.
198. Broers JL, Machiels BM, Kuijpers HJ, Smedts F, van den Kieboom R, Raymond Y, Ramaekers FC: A- and B-type lamins are differentially expressed in normal human tissues. *Histochem Cell Biol* 1997, 107(6):505-517.
199. Furukawa K, Hotta Y: cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *EMBO J* 1993, 12(1):97-106.
200. Lin F, Worman HJ: Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem* 1993, 268(22):16321-16326.
201. Wydner KL, McNeil JA, Lin F, Worman HJ, Lawrence JB: Chromosomal assignment of human nuclear envelope protein genes LMNA, LMNB1, and LBR by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1996, 32(3):474-478.
202. Krohne G, Waizenegger I, Hoger TH: The conserved carboxy-terminal cysteine of nuclear lamins is essential for lamin association with the nuclear envelope. *J Cell Biol* 1989, 109(5):2003-2011.
203. Vorburger K, Kitten GT, Nigg EA: Modification of nuclear lamin proteins by a mevalonic acid derivative occurs in reticulocyte lysates and requires the cysteine residue of the C-terminal CXXM motif. *EMBO J* 1989, 8(13):4007-4013.
204. Worman HJ, Fong LG, Muchir A, Young SG: Laminopathies and the long strange trip from basic cell biology to therapy. *J Clin Invest* 2009, 119(7):1825-1836.
205. Young SG, Meta M, Yang SH, Fong LG: Prelamin A farnesylation and progeroid syndromes. *J Biol Chem* 2006, 281(52):39741-39745.
206. Zhang FL, Casey PJ: Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* 1996, 65:241-269.
207. Bergo MO, Gavino B, Ross J, Schmidt WK, Hong C, Kendall LV, Mohr A, Meta M, Genant H, Jiang Y *et al*: Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle



- weakness, and a prelamin A processing defect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99(20):13049-13054.
208. Corrigan DP, Kuszczak D, Rusinol AE, Thewke DP, Hrycyna CA, Michaelis S, Sinensky MS: Prelamin A endoproteolytic processing in vitro by recombinant Zmpste24. *Biochem J* 2005, 387(Pt 1):129-138.
209. Clarke S, Vogel JP, Deschenes RJ, Stock J: Posttranslational modification of the Ha-ras oncogene protein: evidence for a third class of protein carboxyl methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, 85(13):4643-4647.
210. Dai Q, Choy E, Chiu V, Romano J, Slivka SR, Steitz SA, Michaelis S, Philips MR: Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1998, 273(24):15030-15034.
211. Weber K, Plessmann U, Traub P: Maturation of nuclear lamin A involves a specific carboxy-terminal trimming, which removes the polyisoprenylation site from the precursor; implications for the structure of the nuclear lamina. *FEBS Lett* 1989, 257(2):411-414.
212. Beck LA, Hosick TJ, Sinensky M: Isoprenylation is required for the processing of the lamin A precursor. *J Cell Biol* 1990, 110(5):1489-1499.
213. Dechat T, Pfliegerhaer K, Sengupta K, Shimi T, Shumaker DK, Solimando L, Goldman RD: Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev* 2008, 22(7):832-853.
214. Wilson KL, Foisner R: Lamin-binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010, 2(4):a000554.
215. Starr DA, Hermann GJ, Malone CJ, Fixsen W, Priess JR, Horvitz HR, Han M: unc-83 encodes a novel component of the nuclear envelope and is essential for proper nuclear migration. *Development* 2001, 128(24):5039-5050.
216. Patterson K, Molofsky AB, Robinson C, Acosta S, Cater C, Fischer JA: The functions of Klarsicht and nuclear lamin in developmentally regulated nuclear migrations of photoreceptor cells in the Drosophila eye. *Mol Biol Cell* 2004, 15(2):600-610.
217. Gruenbaum Y, Margalit A, Goldman RD, Shumaker DK, Wilson KL: The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, 6(1):21-31.
218. Houben F, Willems CH, Declercq IL, Hochstenbach K, Kamps MA, Snoeckx LH, Ramaekers FC, Broers JL: Disturbed nuclear orientation and cellular migration in A-type lamin deficient cells. *Biochim Biophys Acta* 2009, 1793(2):312-324.
219. Laguri C, Gilquin B, Wolff N, Romi-Lebrun R, Courchay K, Callebaut I, Worman HJ, Zinn-Justin S: Structural characterization of the LEM motif common to three human inner nuclear membrane proteins. *Structure* 2001, 9(6):503-511.
220. Furukawa K: LAP2 binding protein 1 (L2BP1/BAF) is a candidate mediator of LAP2-chromatin interaction. *J Cell Sci* 1999, 112 ( Pt 15):2485-2492.
221. Segura-Totten M, Wilson KL: BAF: roles in chromatin, nuclear structure and retrovirus integration. *Trends Cell Biol* 2004, 14(5):261-266.
222. Margalit A, Brachner A, Gotzmann J, Foisner R, Gruenbaum Y: Barrier-to-autointegration factor--a BAFfling little protein. *Trends Cell Biol* 2007, 17(4):202-208.
223. Holaska JM, Wilson KL: An emerin "proteome": purification of distinct emerin-containing complexes from HeLa cells suggests molecular basis for diverse roles including gene regulation, mRNA splicing, signaling, mechanosensing, and nuclear architecture. *Biochemistry* 2007, 46(30):8897-8908.
224. Haraguchi T, Koujin T, Osakada H, Kojidani T, Mori C, Masuda H, Hiraoka Y: Nuclear localization of barrier-to-autointegration factor is correlated with progression of S phase in human cells. *J Cell Sci* 2007, 120(Pt 12):1967-1977.
225. Bengtsson L, Wilson KL: Barrier-to-autointegration factor phosphorylation on Ser-4 regulates emerin binding to lamin A in vitro and emerin localization in vivo. *Mol Biol Cell* 2006, 17(3):1154-1163.
226. Montes de Oca R, Lee KK, Wilson KL: Binding of barrier to autointegration factor (BAF) to histone H3 and selected linker histones including H1.1. *J Biol Chem* 2005, 280(51):42252-42262.

227. Capanni C, Cenni V, Haraguchi T, Squarzoni S, Schuchner S, Ogris E, Novelli G, Maraldi N, Lattanzi G: Lamin A precursor induces barrier-to-autointegration factor nuclear localization. *Cell Cycle* 2010, 9(13):2600-2610.
228. Puente XS, Quesada V, Osorio FG, Cabanillas R, Cadinanos J, Fraile JM, Ordonez GR, Puente DA, Gutierrez-Fernandez A, Fanjul-Fernandez M *et al*: Exome sequencing and functional analysis identifies BANF1 mutation as the cause of a hereditary progeroid syndrome. *Am J Hum Genet* 2011, 88(5):650-656.
229. Taniura H, Glass C, Gerace L: A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones. *J Cell Biol* 1995, 131(1):33-44.
230. Neely KE, Workman JL: Histone acetylation and chromatin remodeling: which comes first? *Mol Genet Metab* 2002, 76(1):1-5.
231. Goldman RD, Shumaker DK, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Gordon LB, Gruenbaum Y, Khuon S, Mendez M, Varga R *et al*: Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(24):8963-8968.
232. Shumaker DK, Dechat T, Kohlmaier A, Adam SA, Bozovsky MR, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Khuon S, Collins FS *et al*: Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103(23):8703-8708.
233. Lloyd DJ, Trembath RC, Shackleton S: A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum Mol Genet* 2002, 11(7):769-777.
234. Ozaki T, Saijo M, Murakami K, Enomoto H, Taya Y, Sakiyama S: Complex formation between lamin A and the retinoblastoma gene product: identification of the domain on lamin A required for its interaction. *Oncogene* 1994, 9(9):2649-2653.
235. Ivorra C, Kubicek M, Gonzalez JM, Sanz-Gonzalez SM, Alvarez-Barrientos A, O'Connor JE, Burke B, Andres V: A mechanism of AP-1 suppression through interaction of c-Fos with lamin A/C. *Genes Dev* 2006, 20(3):307-320.
236. Mancini MA, Shan B, Nickerson JA, Penman S, Lee WH: The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91(1):418-422.
237. Markiewicz E, Dechat T, Foisner R, Quinlan RA, Hutchison CJ: Lamin A/C binding protein LAP2alpha is required for nuclear anchorage of retinoblastoma protein. *Mol Biol Cell* 2002, 13(12):4401-4413.
238. Spann TP, Goldman AE, Wang C, Huang S, Goldman RD: Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *J Cell Biol* 2002, 156(4):603-608.
239. Capanni C, Mattioli E, Columbaro M, Lucarelli E, Parnaik VK, Novelli G, Wehnert M, Cenni V, Maraldi NM, Squarzoni S *et al*: Altered pre-lamin A processing is a common mechanism leading to lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 2005, 14(11):1489-1502.
240. Tilgner K, Wojciechowicz K, Jahoda C, Hutchison C, Markiewicz E: Dynamic complexes of A-type lamins and emerin influence adipogenic capacity of the cell via nucleocytoplasmic distribution of beta-catenin. *J Cell Sci* 2009, 122(Pt 3):401-413.
241. Simha V, Garg A: Lipodystrophy: lessons in lipid and energy metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2006, 17(2):162-169.
242. Garcia-Estevez DA, Araujo-Vilar D, Saavedra-Gonzalez A, Fiestras-Janeiro G, Cabezas-Cerrato J: Glucose metabolism in lean patients with mild type 2 diabetes mellitus: evidence for insulin-sensitive and insulin-resistant variants. *Metabolism* 2002, 51(8):1047-1052.
243. Araujo-Vilar D, Garcia-Estevez DA, Cabezas-Cerrato J: Both a reduced acute insulin response to glucose and lower glucose effectiveness are responsible for the worsening of intravenous glucose tolerance in healthy subjects independently of the degree of obesity. *Metabolism* 1998, 47(3):313-320.
244. Garg A, Misra A: Lipodystrophies: rare disorders causing metabolic syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2004, 33(2):305-331.

245. Ziegler L: Lipodystrophies: report of seven cases. *Brain* 1928, 51:145-167.
246. Lawrence RD: Lipodystrophy and hepatomegaly with diabetes, lipaemia, and other metabolic disturbances; a case throwing new light on the action of insulin. (concluded). *Lancet* 1946, 1(6404):773.
247. Misra A, Garg A: Clinical features and metabolic derangements in acquired generalized lipodystrophy: case reports and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2003, 82(2):129-146.
248. Bolan C, Oral EA, Gorden P, Taylor S, Leitman SF: Intensive, long-term plasma exchange therapy for severe hypertriglyceridemia in acquired generalized lipoatrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87(1):380-384.
249. Pardini VC, Victoria IM, Rocha SM, Andrade DG, Rocha AM, Pieroni FB, Milagres G, Purisch S, Velho G: Leptin levels, beta-cell function, and insulin sensitivity in families with congenital and acquired generalized lipotrophic diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83(2):503-508.
250. Araújo-Vilar D: Lipodistrofias: bases moleculares y características clínicas *Endocrinología y Nutrición* 2003, 50:133-144.
251. Garg A: Lipodystrophies. *Am J Med* 2000, 108(2):143-152.
252. Barraquer L: Histoire clinique d'un cas d'atrophie du tissu celluloadipeux *Neurolog Zentralblatt* 1907, 26:1072-1080.
253. Mitchell SW: Singular case of absence of adipose tissue matter in the upper half of the body. *Am J Med Sci* 1885, 90:105-106.
254. Simons A: Lipodystrophia progressive. *Z Ges Neurol Psychiat* 1911, 5:29-38.
255. Hegele RA, Cao H, Liu DM, Costain GA, Charlton-Menys V, Rodger NW, Durrington PN: Sequencing of the reannotated LMNB2 gene reveals novel mutations in patients with acquired partial lipodystrophy. *Am J Hum Genet* 2006, 79(2):383-389.
256. Misra A, Peethambaram A, Garg A: Clinical features and metabolic and autoimmune derangements in acquired partial lipodystrophy: report of 35 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2004, 83(1):18-34.
257. Capeau J, Magre J, Caron-Debarle M, Lagathu C, Antoine B, Bereziat V, Lascols O, Bastard JP, Vigouroux C: Human lipodystrophies: genetic and acquired diseases of adipose tissue. *Endocr Dev* 2010, 19:1-20.
258. Smak Gregoor PJ, van Bommel EF, Ketterings C, van Saase JL, Kramer P: Progressive lipodystrophy, a diagnosis at a glance. *Nephrol Dial Transplant* 1998, 13(2):507-509.
259. O'Mahony D, O'Mahony S, Whelton MJ, McKiernan J: Partial lipodystrophy in coeliac disease. *Gut* 1990, 31(6):717-718.
260. Chen D, Misra A, Garg A: Clinical review 153: Lipodystrophy in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87(11):4845-4856.
261. Hegele RA, Joy TR, Al-Attar SA, Rutt BK: Thematic review series: Adipocyte Biology. Lipodystrophies: windows on adipose biology and metabolism. *J Lipid Res* 2007, 48(7):1433-1444.
262. Grinspoon S: Androgen deficiency and HIV infection. *Clin Infect Dis* 2005, 41(12):1804-1805.
263. Grinspoon S, Carr A: Cardiovascular risk and body-fat abnormalities in HIV-infected adults. *N Engl J Med* 2005, 352(1):48-62.
264. Ristig M, Drechsler H, Powderly WG: Hepatic steatosis and HIV infection. *AIDS Patient Care STDS* 2005, 19(6):356-365.
265. Kosmiski L, Kuritzkes D, Lichtenstein K, Eckel R: Adipocyte-derived hormone levels in HIV lipodystrophy. *Antivir Ther* 2003, 8(1):9-15.
266. Mynarcik DC, Combs T, McNurlan MA, Scherer PE, Komaroff E, Gelato MC: Adiponectin and leptin levels in HIV-infected subjects with insulin resistance and body fat redistribution. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002, 31(5):514-520.
267. Baril JG, Junod P, Leblanc R, Dion H, Therrien R, Laplante F, Falutz J, Cote P, Hebert MN, Lalonde R *et al*: HIV-associated lipodystrophy syndrome: A review of clinical aspects. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2005, 16(4):233-243.

268. Garrabou G, Lopez S, Moren C, Martinez E, Fontdevila J, Cardellach F, Gatell JM, Miro O: Mitochondrial damage in adipose tissue of untreated HIV-infected patients. *AIDS* 2011, 25(2):165-170.
269. Troll JG: Approach to dyslipidemia, lipodystrophy, and cardiovascular risk in patients with HIV infection. *Curr Atheroscler Rep* 2011, 13(1):51-56.
270. Villarroya F, Domingo P, Giralt M: Lipodystrophy associated with highly active anti-retroviral therapy for HIV infection: the adipocyte as a target of anti-retroviral-induced mitochondrial toxicity. *Trends Pharmacol Sci* 2005, 26(2):88-93.
271. Giralt M, Domingo P, Guallar JP, Rodriguez de la Concepcion ML, Alegre M, Domingo JC, Villarroya F: HIV-1 infection alters gene expression in adipose tissue, which contributes to HIV-1/HAART-associated lipodystrophy. *Antivir Ther* 2006, 11(6):729-740.
272. Brinkman K, ter Hofstede HJ, Burger DM, Smeitink JA, Koopmans PP: Adverse effects of reverse transcriptase inhibitors: mitochondrial toxicity as common pathway. *AIDS* 1998, 12(14):1735-1744.
273. Bastard JP, Caron M, Vidal H, Jan V, Auclair M, Vigouroux C, Luboinski J, Laville M, Maachi M, Girard PM *et al*: Association between altered expression of adipogenic factor SREBP1 in lipotrophic adipose tissue from HIV-1-infected patients and abnormal adipocyte differentiation and insulin resistance. *Lancet* 2002, 359(9311):1026-1031.
274. Amiel S: Insulin injection treatment and its complications. In: *Textbook of diabetes*. Edited by Pickup J GE. Oxford: Blackwell Science Ltd; 1997: 1633-1733.
275. Peteiro-Gonzalez D, Fernandez-Rodriguez B, Cabezas-Agricola JM, Araujo-Vilar D: Severe localized lipotrophy related to therapy with insulin analogs in type 1a diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2011, 91(3):e61-63.
276. Nagore E, Sanchez-Motilla JM, Rodriguez-Serna M, Vilata JJ, Aliaga A: Lipotrophy semicircularis--a traumatic panniculitis: report of seven cases and review of the literature. *J Am Acad Dermatol* 1998, 39(5 Pt 2):879-881.
277. De Groot AC: Is lipotrophy semicircularis induced by pressure? *Br J Dermatol* 1994, 131(6):887-890.
278. Requena L, Sanchez Yus E: Panniculitis. Part II. Mostly lobular panniculitis. *J Am Acad Dermatol* 2001, 45(3):325-361; quiz 362-324.
279. Imamura S, Yamada M, Yamamoto K, Yamanishi Y: [Infantile centrifugal abdominal lipodystrophy]. *Hautarzt* 1979, 30(7):360-364.
280. Berardinelli W: An undiagnosed endocrinometabolic syndrome: report of 2 cases. *J Clin Endocrinol Metab* 1954, 14(2):193-204.
281. Seip M: Lipodystrophy and gigantism with associated endocrine manifestations. A new diencephalic syndrome? *Acta Paediatr* 1959, 48:555-574.
282. Seip M, Trygstad O: Generalized lipodystrophy, congenital and acquired (lipotrophy). *Acta Paediatr Suppl* 1996, 413:2-28.
283. Westvik J: Radiological features in generalized lipodystrophy. *Acta Paediatr Suppl* 1996, 413:44-51.
284. Fleckenstein JL, Garg A, Bonte FJ, Vuitch MF, Peshock RM: The skeleton in congenital, generalized lipodystrophy: evaluation using whole-body radiographic surveys, magnetic resonance imaging and technetium-99m bone scintigraphy. *Skeletal Radiol* 1992, 21(6):381-386.
285. Agarwal AK, Simha V, Oral EA, Moran SA, Gorden P, O'Rahilly S, Zaidi Z, Gurakan F, Arslanian SA, Klar A *et al*: Phenotypic and genetic heterogeneity in congenital generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88(10):4840-4847.
286. Van Maldergem L, Magre J, Khallouf TE, Gedde-Dahl T, Jr., Delepine M, Trygstad O, Seemanova E, Stephenson T, Albott CS, Bonnici F *et al*: Genotype-phenotype relationships in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *J Med Genet* 2002, 39(10):722-733.
287. Haque WA, Shimomura I, Matsuzawa Y, Garg A: Serum adiponectin and leptin levels in patients with lipodystrophies. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87(5):2395.
288. Antuna-Puente B, Boutet E, Vigouroux C, Lascols O, Slama L, Caron-Debarle M, Khallouf E, Levy-Marchal C, Capeau J, Bastard JP *et al*: Higher adiponectin levels in patients with

- Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy due to seipin as compared with 1-acylglycerol-3-phosphate-o-acyltransferase-2 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2010, 95(3):1463-1468.
289. Agarwal AK, Garg A: Genetic basis of lipodystrophies and management of metabolic complications. *Annu Rev Med* 2006, 57:297-311.
290. Garg A, Wilson R, Barnes R, Arioglu E, Zaidi Z, Gurakan F, Kocak N, O'Rahilly S, Taylor SI, Patel SB *et al*: A gene for congenital generalized lipodystrophy maps to human chromosome 9q34. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84(9):3390-3394.
291. Agarwal AK, Arioglu E, De Almeida S, Akkoc N, Taylor SI, Bowcock AM, Barnes RI, Garg A: AGPAT2 is mutated in congenital generalized lipodystrophy linked to chromosome 9q34. *Nat Genet* 2002, 31(1):21-23.
292. Agarwal AK, Barnes RI, Garg A: Genetic basis of congenital generalized lipodystrophy. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004, 28(2):336-339.
293. Leung DW: The structure and functions of human lysophosphatidic acid acyltransferases. *Front Biosci* 2001, 6:D944-953.
294. Lewin TM, Wang P, Coleman RA: Analysis of amino acid motifs diagnostic for the sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase reaction. *Biochemistry* 1999, 38(18):5764-5771.
295. Haque W, Garg A, Agarwal AK: Enzymatic activity of naturally occurring 1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase 2 mutants associated with congenital generalized lipodystrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 327(2):446-453.
296. Gale SE, Frolov A, Han X, Bickel PE, Cao L, Bowcock A, Schaffer JE, Ory DS: A regulatory role for 1-acylglycerol-3-phosphate-O-acyltransferase 2 in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2006, 281(16):11082-11089.
297. Lundin C, Nordstrom R, Wagner K, Windpassinger C, Andersson H, von Heijne G, Nilsson I: Membrane topology of the human seipin protein. *FEBS Lett* 2006, 580(9):2281-2284.
298. Ito D, Suzuki N: Seipinopathy: a novel endoplasmic reticulum stress-associated disease. *Brain* 2009, 132(Pt 1):8-15.
299. Ito D, Fujisawa T, Iida H, Suzuki N: Characterization of seipin/BSCL2, a protein associated with spastic paraplegia 17. *Neurobiol Dis* 2008, 31(2):266-277.
300. Payne VA, Grimsey N, Tuthill A, Virtue S, Gray SL, Dalla Nora E, Semple RK, O'Rahilly S, Rochford JJ: The human lipodystrophy gene BSCL2/seipin may be essential for normal adipocyte differentiation. *Diabetes* 2008, 57(8):2055-2060.
301. Chen W, Yechoor VK, Chang BH, Li MV, March KL, Chan L: The human lipodystrophy gene product Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2/seipin plays a key role in adipocyte differentiation. *Endocrinology* 2009, 150(10):4552-4561.
302. Fei W, Shui G, Gaeta B, Du X, Kuerschner L, Li P, Brown AJ, Wenk MR, Parton RG, Yang H: Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast. *J Cell Biol* 2008, 180(3):473-482.
303. Szymanski KM, Binns D, Bartz R, Grishin NV, Li WP, Agarwal AK, Garg A, Anderson RG, Goodman JM: The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104(52):20890-20895.
304. Boutet E, El Mourabit H, Prot M, Nemani M, Khallouf E, Colard O, Maurice M, Durand-Schneider AM, Chretien Y, Gres S *et al*: Seipin deficiency alters fatty acid Delta9 desaturation and lipid droplet formation in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *Biochimie* 2009, 91(6):796-803.
305. Binns D, Lee S, Hilton CL, Jiang QX, Goodman JM: Seipin is a discrete homooligomer. *Biochemistry* 2010, 49(50):10747-10755.
306. Fei W, Du X, Yang H: Seipin, adipogenesis and lipid droplets. *Trends Endocrinol Metab* 2011, 22(6):204-210.
307. Siniossoglou S: Lipins, lipids and nuclear envelope structure. *Traffic* 2009, 10(9):1181-1187.
308. Chakravarthy MV, Lodhi IJ, Yin L, Malapaka RR, Xu HE, Turk J, Semenkovich CF: Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPARalpha in liver. *Cell* 2009, 138(3):476-488.

309. Agarwal AK, Garg A: Congenital generalized lipodystrophy: significance of triglyceride biosynthetic pathways. *Trends Endocrinol Metab* 2003, 14(5):214-221.
310. Fu M, Kazlauskaitė R, Baracho Mde F, Santos MG, Brandao-Neto J, Villares S, Celi FS, Wajchenberg BL, Shuldiner AR: Mutations in Gng3lg and AGPAT2 in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy and Brunzell syndrome: phenotype variability suggests important modifier effects. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89(6):2916-2922.
311. Ebihara K, Kusakabe T, Masuzaki H, Kobayashi N, Tanaka T, Chusho H, Miyazawa T, Hayashi T, Hosoda K *et al*: Gene and phenotype analysis of congenital generalized lipodystrophy in Japanese: a novel homozygous nonsense mutation in seipin gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89(5):2360-2364.
312. Jin J, Cao L, Zhao Z, Shen S, Kiess W, Zhi D, Ye R, Cheng R, Chen L, Yang Y *et al*: Novel BSCL2 gene mutation E189X in Chinese congenital generalized lipodystrophy child with early onset diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2007, 157(6):783-787.
313. Miranda DM, Wajchenberg BL, Calsolari MR, Aguiar MJ, Silva JM, Ribeiro MG, Fonseca C, Amaral D, Boson WL, Resende BA *et al*: Novel mutations of the BSCL2 and AGPAT2 genes in 10 families with Berardinelli-Seip congenital generalized lipodystrophy syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009, 71(4):512-517.
314. Engelman JA, Zhang XL, Lisanti MP: Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers. *FEBS Lett* 1998, 436(3):403-410.
315. Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, Lisanti MP: Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev* 2004, 84(4):1341-1379.
316. Parton RG, Simons K: The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8(3):185-194.
317. Rajab A, Straub V, McCann LJ, Seelow D, Varon R, Barresi R, Schulze A, Lucke B, Lutzkendorf S, Karbasiyan M *et al*: Fatal cardiac arrhythmia and long-QT syndrome in a new form of congenital generalized lipodystrophy with muscle rippling (CGL4) due to PTRF-CAVIN mutations. *PLoS Genet* 2010, 6(3):e1000874.
318. Liu L, Brown D, McKee M, Lebrasseur NK, Yang D, Albrecht KH, Ravid K, Pilch PF: Deletion of Cavin/PTRF causes global loss of caveolae, dyslipidemia, and glucose intolerance. *Cell Metab* 2008, 8(4):310-317.
319. Aboulaich N, Ortegren U, Vener AV, Stralfors P: Association and insulin regulated translocation of hormone-sensitive lipase with PTRF. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 350(3):657-661.
320. Chen L, Lee L, Kudlow BA, Dos Santos HG, Sletvold O, Shafeghati Y, Botha EG, Garg A, Hanson NB, Martin GM *et al*: LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. *Lancet* 2003, 362(9382):440-445.
321. Caux F, Dubosclard E, Lascols O, Buendia B, Chazouilleres O, Cohen A, Courvalin JC, Laroche L, Capeau J, Vigouroux C *et al*: A new clinical condition linked to a novel mutation in lamins A and C with generalized lipoatrophy, insulin-resistant diabetes, disseminated leukomelanodermic papules, liver steatosis, and cardiomyopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88(3):1006-1013.
322. Cao H, Alston L, Ruschman J, Hegele RA: Heterozygous CAV1 frameshift mutations (MIM 601047) in patients with atypical partial lipodystrophy and hypertriglyceridemia. *Lipids Health Dis* 2008, 7:3.
323. Kobberling J, Willms B, Kattermann R, Creutzfeldt W: Lipodystrophy of the extremities. A dominantly inherited syndrome associated with lipatrophic diabetes. *Humangenetik* 1975, 29(2):111-120.
324. Herbst KL, Tannock LR, Deeb SS, Purnell JQ, Brunzell JD, Chait A: Kobberling type of familial partial lipodystrophy: an underrecognized syndrome. *Diabetes Care* 2003, 26(6):1819-1824.
325. Dunnigan MG, Cochrane MA, Kelly A, Scott JW: Familial lipoatrophic diabetes with dominant transmission. A new syndrome. *Q J Med* 1974, 43(169):33-48.

326. Shackleton S, Lloyd DJ, Jackson SN, Evans R, Niermeijer MF, Singh BM, Schmidt H, Brabant G, Kumar S, Durrington PN *et al*: LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet* 2000, 24(2):153-156.
327. Peters JM, Barnes R, Bennett L, Gitomer WM, Bowcock AM, Garg A: Localization of the gene for familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) to chromosome 1q21-22. *Nat Genet* 1998, 18(3):292-295.
328. Morel CF, Thomas MA, Cao H, O'Neil CH, Pickering JG, Foulkes WD, Hegele RA: A LMNA splicing mutation in two sisters with severe Dunnigan-type familial partial lipodystrophy type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, 91(7):2689-2695.
329. Le Dour C, Schneebeli S, Bakiri F, Darcel F, Jacquemont ML, Maubert MA, Auclair M, Jeziorowska D, Reznik Y, Bereziat V *et al*: A homozygous mutation of prelamin-A preventing its farnesylation and maturation leads to a severe lipodystrophic phenotype: new insights into the pathogenicity of nonfarnesylated prelamin-A. *J Clin Endocrinol Metab* 2011, 96(5):E856-862.
330. Garg A, Peshock RM, Fleckenstein JL: Adipose tissue distribution pattern in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84(1):170-174.
331. Garg A: Gender differences in the prevalence of metabolic complications in familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85(5):1776-1782.
332. Decaudain A, Vantyghem MC, Guerci B, Hecart AC, Auclair M, Reznik Y, Narbonne H, Ducluzeau PH, Donadille B, Lebbe C *et al*: New metabolic phenotypes in laminopathies: LMNA mutations in patients with severe metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2007, 92(12):4835-4844.
333. Hegele RA, Kraw ME, Ban MR, Miskie BA, Huff MW, Cao H: Elevated serum C-reactive protein and free fatty acids among nondiabetic carriers of missense mutations in the gene encoding lamin A/C (LMNA) with partial lipodystrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23(1):111-116.
334. Hegele RA: Premature atherosclerosis associated with monogenic insulin resistance. *Circulation* 2001, 103(18):2225-2229.
335. Hegele RA, Cao H, Anderson CM, Hramiak IM: Heterogeneity of nuclear lamin A mutations in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85(9):3431-3435.
336. Speckman RA, Garg A, Du F, Bennett L, Veile R, Arioglu E, Taylor SI, Lovett M, Bowcock AM: Mutational and haplotype analyses of families with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) reveal recurrent missense mutations in the globular C-terminal domain of lamin A/C. *Am J Hum Genet* 2000, 66(4):1192-1198.
337. Vigouroux C, Magre J, Vantyghem MC, Bourut C, Lascols O, Shackleton S, Lloyd DJ, Guerci B, Padova G, Valensi P *et al*: Lamin A/C gene: sex-determined expression of mutations in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy and absence of coding mutations in congenital and acquired generalized lipoatrophy. *Diabetes* 2000, 49(11):1958-1962.
338. Garg A, Speckman RA, Bowcock AM: Multisystem dystrophy syndrome due to novel missense mutations in the amino-terminal head and alpha-helical rod domains of the lamin A/C gene. *Am J Med* 2002, 112(7):549-555.
339. Garg A, Vinaitheerthan M, Weatherall PT, Bowcock AM: Phenotypic heterogeneity in patients with familial partial lipodystrophy (dunnigan variety) related to the site of missense mutations in lamin a/c gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86(1):59-65.
340. Subramanyam L, Simha V, Garg A: Overlapping syndrome with familial partial lipodystrophy, Dunnigan variety and cardiomyopathy due to amino-terminal heterozygous missense lamin A/C mutations. *Clin Genet* 2010, 78(1):66-73.
341. Araujo-Vilar D, Loidi L, Dominguez F, Cabezas-Cerrato J: Phenotypic gender differences in subjects with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety) due to a nuclear lamin A/C R482W mutation. *Horm Metab Res* 2003, 35(1):29-35.
342. Vantyghem MC, Vincent-Desplanques D, Defrance-Faivre F, Capeau J, Fermon C, Valat AS, Lascols O, Hecart AC, Pigny P, Delemer B *et al*: Fertility and obstetrical complications in

- women with LMNA-related familial partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2008, 93(6):2223-2229.
343. Haque WA, Oral EA, Dietz K, Bowcock AM, Agarwal AK, Garg A: Risk factors for diabetes in familial partial lipodystrophy, Dunnigan variety. *Diabetes Care* 2003, 26(5):1350-1355.
344. Agostini M, Schoenmakers E, Mitchell C, Szatmari I, Savage D, Smith A, Rajanayagam O, Semple R, Luan J, Bath L *et al*: Non-DNA binding, dominant-negative, human PPARgamma mutations cause lipodystrophic insulin resistance. *Cell Metab* 2006, 4(4):303-311.
345. Al-Shali K, Cao H, Knoers N, Hermus AR, Tack CJ, Hegele RA: A single-base mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma4 promoter associated with altered in vitro expression and partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89(11):5655-5660.
346. Francis GA, Li G, Casey R, Wang J, Cao H, Leff T, Hegele RA: Peroxisomal proliferator activated receptor-gamma deficiency in a Canadian kindred with familial partial lipodystrophy type 3 (FPLD3). *BMC Med Genet* 2006, 7:3.
347. Hegele RA, Cao H, Frankowski C, Mathews ST, Leff T: PPARG F388L, a transactivation-deficient mutant, in familial partial lipodystrophy. *Diabetes* 2002, 51(12):3586-3590.
348. Hegele RA, Ur E, Ransom TP, Cao H: A frameshift mutation in peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma in familial partial lipodystrophy subtype 3 (FPLD3; MIM 604367). *Clin Genet* 2006, 70(4):360-362.
349. Li G, Leff T: Altered promoter recycling rates contribute to dominant-negative activity of human peroxisome proliferator-activated receptor-gamma mutations associated with diabetes. *Mol Endocrinol* 2007, 21(4):857-864.
350. Monajemi H, Zhang L, Li G, Jenning EH, Cao H, Maas M, Brouwer CB, Kalkhoven E, Stroes E, Hegele RA *et al*: Familial partial lipodystrophy phenotype resulting from a single-base mutation in deoxyribonucleic acid-binding domain of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Clin Endocrinol Metab* 2007, 92(5):1606-1612.
351. Savage DB, Tan GD, Acerini CL, Jebb SA, Agostini M, Gurnell M, Williams RL, Umpleby AM, Thomas EL, Bell JD *et al*: Human metabolic syndrome resulting from dominant-negative mutations in the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes* 2003, 52(4):910-917.
352. Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S: PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest* 2006, 116(3):581-589.
353. Garg A: Clinical review#: Lipodystrophies: genetic and acquired body fat disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 2011, 96(11):3313-3325.
354. Simha V, Garg A: Body fat distribution and metabolic derangements in patients with familial partial lipodystrophy associated with mandibuloacral dysplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87(2):776-785.
355. Agarwal AK, Fryns JP, Auchus RJ, Garg A: Zinc metalloproteinase, ZMPSTE24, is mutated in mandibuloacral dysplasia. *Hum Mol Genet* 2003, 12(16):1995-2001.
356. Miyoshi Y, Akagi M, Agarwal AK, Namba N, Kato-Nishimura K, Mohri I, Yamagata M, Nakajima S, Mushiaki S, Shima M *et al*: Severe mandibuloacral dysplasia caused by novel compound heterozygous ZMPSTE24 mutations in two Japanese siblings. *Clin Genet* 2008, 73(6):535-544.
357. Novelli G, Muchir A, Sangiulio F, Helbling-Leclerc A, D'Apice MR, Massart C, Capon F, Sbraccia P, Federici M, Lauro R *et al*: Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C. *Am J Hum Genet* 2002, 71(2):426-431.
358. Arboleda H, Quintero L, Yunis E: Wiedemann-Rautenstrauch neonatal progeroid syndrome: report of three new patients. *J Med Genet* 1997, 34(5):433-437.
359. Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY, Berglund P *et al*: Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 2003, 423(6937):293-298.
360. De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, Lyonnet S, Stewart CL, Munnich A, Le Merrer M *et al*: Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 2003, 300(5628):2055.



361. Dechat T, Shimi T, Adam SA, Rusinol AE, Andres DA, Spielmann HP, Sinensky MS, Goldman RD: Alterations in mitosis and cell cycle progression caused by a mutant lamin A known to accelerate human aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104(12):4955-4960.
362. Young SG, Fong LG, Michaelis S: Prelamin A, Zmpste24, misshapen cell nuclei, and progeria--new evidence suggesting that protein farnesylation could be important for disease pathogenesis. *J Lipid Res* 2005, 46(12):2531-2558.
363. Yang SH, Bergo MO, Toth JJ, Qiao X, Hu Y, Sandoval S, Meta M, Bendale P, Gelb MH, Young SG *et al*: Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear blebbing in mouse fibroblasts with a targeted Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(29):10291-10296.
364. Scaffidi P, Misteli T: Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nat Cell Biol* 2008, 10(4):452-459.
365. Merideth MA, Gordon LB, Clauss S, Sachdev V, Smith AC, Perry MB, Brewer CC, Zalewski C, Kim HJ, Solomon B *et al*: Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *N Engl J Med* 2008, 358(6):592-604.
366. Dominguez-Gerpe L, Araujo-Vilar D: Prematurely aged children: molecular alterations leading to Hutchinson-Gilford progeria and Werner syndromes. *Curr Aging Sci* 2008, 1(3):202-212.
367. Garg A, Subramanyam L, Agarwal AK, Simha V, Levine B, D'Apice MR, Novelli G, Crow Y: Atypical progeroid syndrome due to heterozygous missense LMNA mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2009, 94(12):4971-4983.
368. Cabanillas R, Cadinanos J, Villameytide JA, Perez M, Longo J, Richard JM, Alvarez R, Duran NS, Illan R, Gonzalez DJ *et al*: Nestor-Guillermo progeria syndrome: a novel premature aging condition with early onset and chronic development caused by BANF1 mutations. *Am J Med Genet A* 2011, 155A(11):2617-2625.
369. Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA, Ikemoto S, Bashmakov Y, Goldstein JL, Brown MS: Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev* 1998, 12(20):3182-3194.
370. Kim S, Huang LW, Snow KJ, Ablamunits V, Hasham MG, Young TH, Paulk AC, Richardson JE, Affourtit JP, Shalom-Barak T *et al*: A mouse model of conditional lipodystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104(42):16627-16632.
371. Wojtanik KM, Edgemon K, Viswanadha S, Lindsey B, Haluzik M, Chen W, Poy G, Reitman M, Londos C: The role of LMNA in adipose: a novel mouse model of lipodystrophy based on the Dunnigan-type familial partial lipodystrophy mutation. *J Lipid Res* 2009, 50(6):1068-1079.
372. Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, Taylor LR, Wilson DR, Darlington GJ: Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 1995, 269(5227):1108-1112.
373. Linhart HG, Ishimura-Oka K, DeMayo F, Kibe T, Repka D, Poindexter B, Bick RJ, Darlington GJ: C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98(22):12532-12537.
374. Pendas AM, Zhou Z, Cadinanos J, Freije JM, Wang J, Hultenby K, Astudillo A, Wernerson A, Rodriguez F, Tryggvason K *et al*: Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet* 2002, 31(1):94-99.
375. Jones JR, Barrick C, Kim KA, Lindner J, Blondeau B, Fujimoto Y, Shiota M, Kesterson RA, Kahn BB, Magnuson MA: Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(17):6207-6212.
376. Langner CA, Birkenmeier EH, Ben-Zeev O, Schotz MC, Sweet HO, Davisson MT, Gordon JI: The fatty liver dystrophy (fld) mutation. A new mutant mouse with a developmental abnormality in triglyceride metabolism and associated tissue-specific defects in lipoprotein lipase and hepatic lipase activities. *J Biol Chem* 1989, 264(14):7994-8003.

377. Langner CA, Birkenmeier EH, Roth KA, Bronson RT, Gordon JI: Characterization of the peripheral neuropathy in neonatal and adult mice that are homozygous for the fatty liver dystrophy (fld) mutation. *J Biol Chem* 1991, 266(18):11955-11964.
378. Peterfy M, Phan J, Xu P, Reue K: Lipodystrophy in the fld mouse results from mutation of a new gene encoding a nuclear protein, lipin. *Nat Genet* 2001, 27(1):121-124.
379. Cui X, Wang Y, Tang Y, Liu Y, Zhao L, Deng J, Xu G, Peng X, Ju S, Liu G *et al*: Seipin ablation in mice results in severe generalized lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 2011, 20(15):3022-3030.
380. Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L, Muntoni F, Greenberg CR, Gary F, Urtizberea JA *et al*: Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 1999, 21(3):285-288.
381. Muchir A, Bonne G, van der Kooi AJ, van Meegen M, Baas F, Bolhuis PA, de Visser M, Schwartz K: Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet* 2000, 9(9):1453-1459.
382. Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, Wolff MR, Porcu M, Frenneaux M, Atherton J, Vidaillet HJ, Jr., Spudich S, De Girolami U *et al*: Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med* 1999, 341(23):1715-1724.
383. De Sandre-Giovannoli A, Chaouch M, Kozlov S, Vallat JM, Tazir M, Kassouri N, Szepietowski P, Hammadouche T, Vandenberghe A, Stewart CL *et al*: Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet* 2002, 70(3):726-736.
384. Hegele RA: Lessons from human mutations in PPARgamma. *Int J Obes (Lond)* 2005, 29 Suppl 1:S31-35.
385. Zirn B, Kress W, Grimm T, Berthold LD, Neubauer B, Kuchelmeister K, Muller U, Hahn A: Association of homozygous LMNA mutation R471C with new phenotype: mandibuloacral dysplasia, progeria, and rigid spine muscular dystrophy. *Am J Med Genet A* 2008, 146A(8):1049-1054.
386. Carboni N, Mura M, Marrosu G, Cocco E, Ahmad M, Solla E, Mateddu A, Maioli MA, Marini S, Nissardi V *et al*: Muscle MRI findings in patients with an apparently exclusive cardiac phenotype due to a novel LMNA gene mutation. *Neuromuscul Disord* 2008, 18(4):291-298.
387. Muschke P, Kolsch U, Jakubiczka S, Wieland I, Brune T, Wieacker P: The heterozygous LMNA mutation p.R471G causes a variable phenotype with features of two types of familial partial lipodystrophy. *Am J Med Genet A* 2007, 143A(23):2810-2814.
388. Lanktree M, Cao H, Rabkin SW, Hanna A, Hegele RA: Novel LMNA mutations seen in patients with familial partial lipodystrophy subtype 2 (FPLD2; MIM 151660). *Clin Genet* 2007, 71(2):183-186.
389. Herrmann H, Aebi U: Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem* 2004, 73:749-789.
390. Worman HJ, Courvalin JC: How do mutations in lamins A and C cause disease? *J Clin Invest* 2004, 113(3):349-351.
391. Hegele R: LMNA mutation position predicts organ system involvement in laminopathies. *Clin Genet* 2005, 68(1):31-34.
392. Capell BC, Collins FS: Human laminopathies: nuclei gone genetically awry. *Nat Rev Genet* 2006, 7(12):940-952.
393. Hutchison CJ, Worman HJ: A-type lamins: guardians of the soma? *Nat Cell Biol* 2004, 6(11):1062-1067.
394. Hutchison CJ, Alvarez-Reyes M, Vaughan OA: Lamins in disease: why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue-specific disease phenotypes? *J Cell Sci* 2001, 114(Pt 1):9-19.

395. Broers JL, Ramaekers FC: Dynamics of nuclear lamina assembly and disassembly. *Symp Soc Exp Biol* 2004(56):177-192.
396. Raz V, Carlotti F, Vermolen BJ, van der Poel E, Sloos WC, Knaan-Shanzer S, de Vries AA, Hoeben RC, Young IT, Tanke HJ *et al*: Changes in lamina structure are followed by spatial reorganization of heterochromatic regions in caspase-8-activated human mesenchymal stem cells. *J Cell Sci* 2006, 119(Pt 20):4247-4256.
397. Columbaro M, Capanni C, Mattioli E, Novelli G, Parnaik VK, Squarzone S, Maraldi NM, Lattanzi G: Rescue of heterochromatin organization in Hutchinson-Gilford progeria by drug treatment. *Cell Mol Life Sci* 2005, 62(22):2669-2678.
398. Filesi I, Gullotta F, Lattanzi G, D'Apice MR, Capanni C, Nardone AM, Columbaro M, Scarano G, Mattioli E, Sabatelli P *et al*: Alterations of nuclear envelope and chromatin organization in mandibuloacral dysplasia, a rare form of laminopathy. *Physiol Genomics* 2005, 23(2):150-158.
399. Kennedy BK, Barbie DA, Classon M, Dyson N, Harlow E: Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells. *Genes Dev* 2000, 14(22):2855-2868.
400. Nitta RT, Jameson SA, Kudlow BA, Conlan LA, Kennedy BK: Stabilization of the retinoblastoma protein by A-type nuclear lamins is required for INK4A-mediated cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* 2006, 26(14):5360-5372.
401. Naetar N, Korbei B, Kozlov S, Kerenyi MA, Dorner D, Kral R, Gotic I, Fuchs P, Cohen TV, Bittner R *et al*: Loss of nucleoplasmic LAP2alpha-lamin A complexes causes erythroid and epidermal progenitor hyperproliferation. *Nat Cell Biol* 2008, 10(11):1341-1348.
402. Constantinescu D, Gray HL, Sammak PJ, Schatten GP, Csoka AB: Lamin A/C expression is a marker of mouse and human embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells* 2006, 24(1):177-185.
403. Pajerowski JD, Dahl KN, Zhong FL, Sammak PJ, Discher DE: Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104(40):15619-15624.
404. Favreau C, Higuier D, Courvalin JC, Buendia B: Expression of a mutant lamin A that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy inhibits in vitro differentiation of C2C12 myoblasts. *Mol Cell Biol* 2004, 24(4):1481-1492.
405. Bridger JM, Kill IR: Aging of Hutchinson-Gilford progeria syndrome fibroblasts is characterised by hyperproliferation and increased apoptosis. *Exp Gerontol* 2004, 39(5):717-724.
406. Mounkes LC, Kozlov S, Hernandez L, Sullivan T, Stewart CL: A progeroid syndrome in mice is caused by defects in A-type lamins. *Nature* 2003, 423(6937):298-301.
407. Shackleton S, Smallwood DT, Clayton P, Wilson LC, Agarwal AK, Garg A, Trembath RC: Compound heterozygous ZMPSTE24 mutations reduce prelamin A processing and result in a severe progeroid phenotype. *J Med Genet* 2005, 42(6):e36.
408. Fong LG, Frost D, Meta M, Qiao X, Yang SH, Coffinier C, Young SG: A protein farnesyltransferase inhibitor ameliorates disease in a mouse model of progeria. *Science* 2006, 311(5767):1621-1623.
409. Fong LG, Ng JK, Meta M, Cote N, Yang SH, Stewart CL, Sullivan T, Burghardt A, Majumdar S, Reue K *et al*: Heterozygosity for Lmna deficiency eliminates the progeria-like phenotypes in Zmpste24-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(52):18111-18116.
410. Toth JI, Yang SH, Qiao X, Beigneux AP, Gelb MH, Moulson CL, Miner JH, Young SG, Fong LG: Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear shape in fibroblasts from humans with progeroid syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(36):12873-12878.
411. Liu B, Wang J, Chan KM, Tjia WM, Deng W, Guan X, Huang JD, Li KM, Chau PY, Chen DJ *et al*: Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat Med* 2005, 11(7):780-785.
412. Varela I, Cadinanos J, Pendas AM, Gutierrez-Fernandez A, Folgueras AR, Sanchez LM, Zhou Z, Rodriguez FJ, Stewart CL, Vega JA *et al*: Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* 2005, 437(7058):564-568.
413. Andres V, Gonzalez JM: Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization. *J Cell Biol* 2009, 187(7):945-957.

414. Clevers H: Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 2006, 127(3):469-480.
415. Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA: Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 2000, 289(5481):950-953.
416. Moldes M, Zuo Y, Morrison RF, Silva D, Park BH, Liu J, Farmer SR: Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis. *Biochem J* 2003, 376(Pt 3):607-613.
417. Espada J, Varela I, Flores I, Ugalde AP, Cadinanos J, Pendas AM, Stewart CL, Tryggvason K, Blasco MA, Freije JM *et al*: Nuclear envelope defects cause stem cell dysfunction in premature-aging mice. *J Cell Biol* 2008, 181(1):27-35.
418. Duesing K, Charpentier G, Marre M, Tichet J, Hercberg S, Froguel P, Gibson F: Evaluating the association of common LMNA variants with type 2 diabetes and quantitative metabolic phenotypes in French Europids. *Diabetologia* 2008, 51(1):76-81.
419. Steinle NI, Kazlauskaitė R, Imumorin IG, Hsueh WC, Pollin TI, O'Connell JR, Mitchell BD, Shuldiner AR: Variation in the lamin A/C gene: associations with metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, 24(9):1708-1713.
420. Wegner L, Andersen G, Sparso T, Grarup N, Glumer C, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, Hansen T, Pedersen O: Common variation in LMNA increases susceptibility to type 2 diabetes and associates with elevated fasting glycemia and estimates of body fat and height in the general population: studies of 7,495 Danish whites. *Diabetes* 2007, 56(3):694-698.
421. Owen KR, Groves CJ, Hanson RL, Knowler WC, Shuldiner AR, Elbein SC, Mitchell BD, Froguel P, Ng MC, Chan JC *et al*: Common variation in the LMNA gene (encoding lamin A/C) and type 2 diabetes: association analyses in 9,518 subjects. *Diabetes* 2007, 56(3):879-883.
422. Mesa JL, Loos RJ, Franks PW, Ong KK, Luan J, O'Rahilly S, Wareham NJ, Barroso I: Lamin A/C polymorphisms, type 2 diabetes, and the metabolic syndrome: case-control and quantitative trait studies. *Diabetes* 2007, 56(3):884-889.
423. Murase Y, Yagi K, Katsuda Y, Asano A, Koizumi J, Mabuchi H: An LMNA variant is associated with dyslipidemia and insulin resistance in the Japanese. *Metabolism* 2002, 51(8):1017-1021.
424. Levy JC, Matthews DR, Hermans MP: Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program. *Diabetes Care* 1998, 21(12):2191-2192.
425. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC: Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985, 28(7):412-419.
426. Ascaso JF, Romero P, Real JT, Lorente RI, Martinez-Valls J, Carmena R: Abdominal obesity, insulin resistance, and metabolic syndrome in a southern European population. *Eur J Intern Med* 2003, 14(2):101-106.
427. Bergman RN, Ider YZ, Bowden CR, Cobelli C: Quantitative estimation of insulin sensitivity. *Am J Physiol* 1979, 236(6):E667-677.
428. Araujo-Vilar D, Rega-Liste CA, Garcia-Estevez DA, Sarmiento-Escalona F, Mosquera-Tallon V, Cabezas-Cerrato J: Minimal model of glucose metabolism: modified equations and its application in the study of insulin sensitivity in obese subjects. *Diabetes Res Clin Pract* 1998, 39(2):129-141.
429. Ward GM, Weber KM, Walters IM, Aitken PM, Lee B, Best JD, Boston RC, Alford FP: A modified minimal model analysis of insulin sensitivity and glucose-mediated glucose disposal in insulin-dependent diabetes. *Metabolism* 1991, 40(1):4-9.
430. Boyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1968, 97:77-89.
431. Sambrook JaR, DW: Molecular Cloning: A Laboratory Manual New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

432. Zini N, Avnet S, Ghisu S, Maraldi NM, Squarzoni S, Baldini N, Lattanzi G: Effects of prelamin A processing inhibitors on the differentiation and activity of human osteoclasts. *J Cell Biochem* 2008, 105(1):34-40.
433. Freshney R: Culture of animal cells: a manual of basic techniques 4th edn. NY, USA.; 2000.
434. Parpal S, Karlsson M, Thorn H, Stralfors P: Cholesterol depletion disrupts caveolae and insulin receptor signaling for metabolic control via insulin receptor substrate-1, but not for mitogen-activated protein kinase control. *J Biol Chem* 2001, 276(13):9670-9678.
435. Caron M, Auclair M, Vigouroux C, Glorian M, Forest C, Capeau J: The HIV protease inhibitor indinavir impairs sterol regulatory element-binding protein-1 intranuclear localization, inhibits preadipocyte differentiation, and induces insulin resistance. *Diabetes* 2001, 50(6):1378-1388.
436. Savage DB, Soos MA, Powlson A, O'Rahilly S, McFarlane I, Halsall DJ, Barroso I, Thomas EL, Bell JD, Scobie I *et al*: Familial partial lipodystrophy associated with compound heterozygosity for novel mutations in the LMNA gene. *Diabetologia* 2004, 47(4):753-756.
437. Verstraeten VL, Broers JL, van Steensel MA, Zinn-Justin S, Ramaekers FC, Steijlen PM, Kamps M, Kuipers HJ, Merckx D, Smeets HJ *et al*: Compound heterozygosity for mutations in LMNA causes a progeria syndrome without prelamin A accumulation. *Hum Mol Genet* 2006, 15(16):2509-2522.
438. Huong LTT: Molecular genetic studies in hereditary laminopathies of man Germany: Ernst-Moritz-Arndt-Universität; 2010.
439. Hirschey MD, Shimazu T, Goetzman E, Jing E, Schwer B, Lombard DB, Grueter CA, Harris C, Biddinger S, Ilkayeva OR *et al*: SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature* 2010, 464(7285):121-125.
440. Worman HJ, Bonne G: "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases. *Exp Cell Res* 2007, 313(10):2121-2133.
441. Schmidt HH, Genschel J, Baier P, Schmidt M, Ockenga J, Tietge UJ, Propsting M, Buttner C, Manns MP, Lochs H *et al*: Dyslipemia in familial partial lipodystrophy caused by an R482W mutation in the LMNA gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86(5):2289-2295.
442. Vantyghem MC, Pigny P, Maurage CA, Rouaix-Emery N, Stojkovic T, Cuisset JM, Millaire A, Lascols O, Vermersch P, Wemeau JL *et al*: Patients with familial partial lipodystrophy of the Dunnigan type due to a LMNA R482W mutation show muscular and cardiac abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89(11):5337-5346.
443. Beamer BA, Yen CJ, Andersen RE, Muller D, Elahi D, Cheskin LJ, Andres R, Roth J, Shuldiner AR: Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene with obesity in two Caucasian populations. *Diabetes* 1998, 47(11):1806-1808.
444. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J: A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 1998, 20(3):284-287.
445. Masugi J, Tamori Y, Mori H, Koike T, Kasuga M: Inhibitory effect of a proline-to-alanine substitution at codon 12 of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 on thiazolidinedione-induced adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000, 268(1):178-182.
446. Scharner J, Gnocchi VF, Ellis JA, Zammit PS: Genotype-phenotype correlations in laminopathies: how does fate translate? *Biochem Soc Trans* 2010, 38(Pt 1):257-262.
447. Kandert S, Wehnert M, Muller CR, Buendia B, Dabauvalle MC: Impaired nuclear functions lead to increased senescence and inefficient differentiation in human myoblasts with a dominant p.R545C mutation in the LMNA gene. *Eur J Cell Biol* 2009, 88(10):593-608.
448. Vytopil M, Benedetti S, Ricci E, Galluzzi G, Dello Russo A, Merlini L, Boriani G, Gallina M, Morandi L, Politano L *et al*: Mutation analysis of the lamin A/C gene (LMNA) among patients with different cardiomyopathic phenotypes. *J Med Genet* 2003, 40(12):e132.
449. Forissier JE, Bonne G, Bouchier C, Duboscq-Bidot L, Richard P, Briault S, Moraine C, Dubourg O, Schwartz K, Komajda M: [Apical left ventricular aneurysm without atrio-

- ventricular block due to a lamin A/C gene mutation]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2005, 98(1):67-70.
450. Worman HJ, Courvalin JC: The nuclear lamina and inherited disease. *Trends Cell Biol* 2002, 12(12):591-598.
  451. Wimley WC, White SH: Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces. *Nat Struct Biol* 1996, 3(10):842-848.
  452. Machiels BM, Broers JL, Raymond Y, de Ley L, Kuijpers HJ, Caberg NE, Ramaekers FC: Abnormal A-type lamin organization in a human lung carcinoma cell line. *Eur J Cell Biol* 1995, 67(4):328-335.
  453. Machiels BM, Zorenc AH, Endert JM, Kuijpers HJ, van Eys GJ, Ramaekers FC, Broers JL: An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. *J Biol Chem* 1996, 271(16):9249-9253.
  454. Broers JL, Raymond Y, Rot MK, Kuijpers H, Wagenaar SS, Ramaekers FC: Nuclear A-type lamins are differentially expressed in human lung cancer subtypes. *Am J Pathol* 1993, 143(1):211-220.
  455. Pugh GE, Coates PJ, Lane EB, Raymond Y, Quinlan RA: Distinct nuclear assembly pathways for lamins A and C lead to their increase during quiescence in Swiss 3T3 cells. *J Cell Sci* 1997, 110 ( Pt 19):2483-2493.
  456. van der Kooi AJ, Bonne G, Eymard B, Duboc D, Talim B, Van der Valk M, Reiss P, Richard P, Demay L, Merlini L *et al*: Lamin A/C mutations with lipodystrophy, cardiac abnormalities, and muscular dystrophy. *Neurology* 2002, 59(4):620-623.
  457. Muchir A, Worman HJ: The nuclear envelope and human disease. *Physiology (Bethesda)* 2004, 19:309-314.
  458. Broers JL, Peeters EA, Kuijpers HJ, Endert J, Bouten CV, Oomens CW, Baaijens FP, Ramaekers FC: Decreased mechanical stiffness in LMNA-/- cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies. *Hum Mol Genet* 2004, 13(21):2567-2580.
  459. Sasseville AM, Langelier Y: In vitro interaction of the carboxy-terminal domain of lamin A with actin. *FEBS Lett* 1998, 425(3):485-489.
  460. Croft DR, Coleman ML, Li S, Robertson D, Sullivan T, Stewart CL, Olson MF: Actin-myosin-based contraction is responsible for apoptotic nuclear disintegration. *J Cell Biol* 2005, 168(2):245-255.
  461. Vigouroux C, Auclair M, Dubosclard E, Pouchelet M, Capeau J, Courvalin JC, Buendia B: Nuclear envelope disorganization in fibroblasts from lipodystrophic patients with heterozygous R482Q/W mutations in the lamin A/C gene. *J Cell Sci* 2001, 114(Pt 24):4459-4468.
  462. Capanni C, Cenni V, Mattioli E, Sabatelli P, Ognibene A, Columbaro M, Parnaik VK, Wehnert M, Maraldi NM, Squarzone S *et al*: Failure of lamin A/C to functionally assemble in R482L mutated familial partial lipodystrophy fibroblasts: altered intermolecular interaction with emerin and implications for gene transcription. *Exp Cell Res* 2003, 291(1):122-134.
  463. Vigouroux C, Caron-Debarle M, Le Dour C, Magre J, Capeau J: Molecular mechanisms of human lipodystrophies: from adipocyte lipid droplet to oxidative stress and lipotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol* 2011, 43(6):862-876.
  464. Ludtke A, Buettner J, Wu W, Muchir A, Schroeter A, Zinn-Justin S, Spuler S, Schmidt HH, Worman HJ: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma C190S mutation causes partial lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2007, 92(6):2248-2255.
  465. Ludtke A, Buettner J, Schmidt HH, Worman HJ: New PPARG mutation leads to lipodystrophy and loss of protein function that is partially restored by a synthetic ligand. *J Med Genet* 2007, 44(9):e88.
  466. Bonnet E, Delpierre C, Sommet A, Marion-Latard F, Herve R, Aquilina C, Labau E, Obadia M, Marchou B, Massip P *et al*: Total body composition by DXA of 241 HIV-negative men and 162 HIV-infected men: proposal of reference values for defining lipodystrophy. *J Clin Densitom* 2005, 8(3):287-292.

467. Valerio CM, Godoy-Matos A, Moreira RO, Carraro L, Guedes EP, Moises RS, Mory PB, de Souza LL, Russo LA, Melazzi AC: Dual-energy X-ray absorptiometry study of body composition in patients with lipodystrophy. *Diabetes Care* 2007, 30(7):1857-1859.
468. Godoy-Matos AF, Moreira RO, Valerio CM, Mory PB, Moises RS: A new method for body fat evaluation, body adiposity index, is useful in women with familial partial lipodystrophy. *Obesity (Silver Spring)* 2012, 20(2):440-443.
469. Turgeon JL, Carr MC, Maki PM, Mendelsohn ME, Wise PM: Complex actions of sex steroids in adipose tissue, the cardiovascular system, and brain: Insights from basic science and clinical studies. *Endocr Rev* 2006, 27(6):575-605.
470. Kang SM, Yoon JW, Ahn HY, Kim SY, Lee KH, Shin H, Choi SH, Park KS, Jang HC, Lim S: Android fat depot is more closely associated with metabolic syndrome than abdominal visceral fat in elderly people. *PLoS One* 2011, 6(11):e27694.
471. Manolopoulos KN, Karpe F, Frayn KN: Gluteofemoral body fat as a determinant of metabolic health. *Int J Obes (Lond)* 2010, 34(6):949-959.
472. Liang H, Murase Y, Katuta Y, Asano A, Kobayashi J, Mabuchi H: Association of LMNA 1908C/T polymorphism with cerebral vascular disease and diabetic nephropathy in Japanese men with type 2 diabetes. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005, 63(3):317-322.
473. Wegner L, Anthonsen S, Bork-Jensen J, Dalgaard L, Hansen T, Pedersen O, Poulsen P, Vaag A: LMNA rs4641 and the muscle lamin A and C isoforms in twins--metabolic implications and transcriptional regulation. *J Clin Endocrinol Metab* 2010, 95(8):3884-3892.
474. Hegele RA, Huff MW, Young TK: Common genomic variation in LMNA modulates indexes of obesity in Inuit. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86(6):2747-2751.
475. Wajchenberg BL: Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000, 21(6):697-738.
476. Pujol E, Rodriguez-Cuenca S, Frontera M, Justo R, Llado I, Kraemer FB, Gianotti M, Roca P: Gender- and site-related effects on lipolytic capacity of rat white adipose tissue. *Cell Mol Life Sci* 2003, 60(9):1982-1989.
477. Rodriguez-Cuenca S, Monjo M, Proenza AM, Roca P: Depot differences in steroid receptor expression in adipose tissue: possible role of the local steroid milieu. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005, 288(1):E200-207.
478. Lelliott CJ, Logie L, Sewter CP, Berger D, Jani P, Blows F, O'Rahilly S, Vidal-Puig A: Lamin expression in human adipose cells in relation to anatomical site and differentiation state. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87(2):728-734.
479. Caron M, Auclair M, Donadille B, Bereziat V, Guerci B, Laville M, Narbonne H, Bodemer C, Lascols O, Capeau J *et al*: Human lipodystrophies linked to mutations in A-type lamins and to HIV protease inhibitor therapy are both associated with prelamin A accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence. *Cell Death Differ* 2007, 14(10):1759-1767.
480. Boguslavsky RL, Stewart CL, Worman HJ: Nuclear lamin A inhibits adipocyte differentiation: implications for Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 2006, 15(4):653-663.
481. Morrison RF, Farmer SR: Insights into the transcriptional control of adipocyte differentiation. *J Cell Biochem* 1999, Suppl 32-33:59-67.
482. Mattioli E, Columbaro M, Capanni C, Santi S, Maraldi NM, D'Apice MR, Novelli G, Riccio M, Squarzone S, Foisner R *et al*: Drugs affecting prelamin A processing: effects on heterochromatin organization. *Exp Cell Res* 2008, 314(3):453-462.
483. Maraldi NM, Capanni C, Lattanzi G, Camozzi D, Facchini A, Manzoli FA: SREBP1 interaction with prelamin A forms: a pathogenic mechanism for lipodystrophic laminopathies. *Adv Enzyme Regul* 2008, 48:209-223.
484. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM: Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994, 79(7):1147-1156.
485. Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J: Transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 1998, 10(2):165-173.

486. Ren D, Collingwood TN, Rebar EJ, Wolffe AP, Camp HS: PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev* 2002, 16(1):27-32.
487. Freedman BD, Lee EJ, Park Y, Jameson JL: A dominant negative peroxisome proliferator-activated receptor-gamma knock-in mouse exhibits features of the metabolic syndrome. *J Biol Chem* 2005, 280(17):17118-17125.
488. Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, Fruchart JC, Briggs M, Spiegelman BM, Auwerx J: Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol* 1999, 19(8):5495-5503.
489. Eckel RH: Lipoprotein lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med* 1989, 320(16):1060-1068.
490. Frolov MV, Dyson NJ: Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci* 2004, 117(Pt 11):2173-2181.
491. Chen PL, Riley DJ, Chen Y, Lee WH: Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. *Genes Dev* 1996, 10(21):2794-2804.
492. Fajas L, Egler V, Reiter R, Hansen J, Kristiansen K, Debril MB, Miard S, Auwerx J: The retinoblastoma-histone deacetylase 3 complex inhibits PPARgamma and adipocyte differentiation. *Dev Cell* 2002, 3(6):903-910.
493. Kirma N, Gill K, Mandava U, Tekmal RR: Overexpression of aromatase leads to hyperplasia and changes in the expression of genes involved in apoptosis, cell cycle, growth, and tumor suppressor functions in the mammary glands of transgenic mice. *Cancer Res* 2001, 61(5):1910-1918.
494. Tekmal RR, Nair HB, Perla RP, Kirma N: HER-2/neu x aromatase double transgenic mice model: the effects of aromatase overexpression on mammary tumorigenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007, 106(1-5):111-118.
495. Agarwal VR, Ashanullah CI, Simpson ER, Bulun SE: Alternatively spliced transcripts of the aromatase cytochrome P450 (CYP19) gene in adipose tissue of women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82(1):70-74.
496. Richon VM, Lyle RE, McGehee RE, Jr.: Regulation and expression of retinoblastoma proteins p107 and p130 during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 1997, 272(15):10117-10124.
497. Higgins C, Chatterjee S, Cherington V: The block of adipocyte differentiation by a C-terminally truncated, but not by full-length, simian virus 40 large tumor antigen is dependent on an intact retinoblastoma susceptibility protein family binding domain. *J Virol* 1996, 70(2):745-752.
498. Johnson BR, Nitta RT, Frock RL, Mounkes L, Barbie DA, Stewart CL, Harlow E, Kennedy BK: A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101(26):9677-9682.
499. Mariappan I, Gurung R, Thanumalayan S, Parnaik VK: Identification of cyclin D3 as a new interaction partner of lamin A/C. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 355(4):981-985.
500. Wang C, Pattabiraman N, Zhou JN, Fu M, Sakamaki T, Albanese C, Li Z, Wu K, Hulit J, Neumeister P *et al*: Cyclin D1 repression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and transactivation. *Mol Cell Biol* 2003, 23(17):6159-6173.
501. Gotzmann J, Foisner R: A-type lamin complexes and regenerative potential: a step towards understanding laminopathic diseases? *Histochem Cell Biol* 2006, 125(1-2):33-41.
502. Lattanzi G, Ognibene A, Sabatelli P, Capanni C, Toniolo D, Columbaro M, Santi S, Riccio M, Merlini L, Maraldi NM *et al*: Emerin expression at the early stages of myogenic differentiation. *Differentiation* 2000, 66(4-5):208-217.
503. Yang X, Enerback S, Smith U: Reduced expression of FOXC2 and brown adipogenic genes in human subjects with insulin resistance. *Obes Res* 2003, 11(10):1182-1191.



504. Dubois SG, Heilbronn LK, Smith SR, Albu JB, Kelley DE, Ravussin E: Decreased expression of adipogenic genes in obese subjects with type 2 diabetes. *Obesity (Silver Spring)* 2006, 14(9):1543-1552.
505. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM, Perry JR, Elliott KS, Lango H, Rayner NW *et al*: A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007, 316(5826):889-894.
506. Kloting N, Schleinitz D, Ruschke K, Berndt J, Fasshauer M, Tonjes A, Schon MR, Kovacs P, Stumvoll M, Bluher M: Inverse relationship between obesity and FTO gene expression in visceral adipose tissue in humans. *Diabetologia* 2008, 51(4):641-647.
507. Bereziat V, Cervera P, Le Dour C, Verpont MC, Dumont S, Vantyghem MC, Capeau J, Vigouroux C: LMNA mutations induce a non-inflammatory fibrosis and a brown fat-like dystrophy of enlarged cervical adipose tissue. *Am J Pathol* 2011, 179(5):2443-2453.
508. Bourlier V, Bouloumie A: Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance. *Diabetes Metab* 2009, 35(4):251-260.
509. Lagathu C, Eustace B, Prot M, Frantz D, Gu Y, Bastard JP, Maachi M, Azoulay S, Briggs M, Caron M *et al*: Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. *Antivir Ther* 2007, 12(4):489-500.
510. Herrero L, Shapiro H, Nayer A, Lee J, Shoelson SE: Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107(1):240-245.
511. Suga H, Eto H, Inoue K, Aoi N, Kato H, Araki J, Higashino T, Yoshimura K: Cellular and molecular features of lipoma tissue: comparison with normal adipose tissue. *Br J Dermatol* 2009, 161(4):819-825.
512. Guallar JP, Vila MR, Lopez-Gallardo E, Solano A, Domingo JC, Gamez J, Pineda M, Capablo JL, Domingo P, Andreu AL *et al*: Altered expression of master regulatory genes of adipogenesis in lipomas from patients bearing tRNA(Lys) point mutations in mitochondrial DNA. *Mol Genet Metab* 2006, 89(3):283-285.
513. Guallar JP, Gallego-Escuredo JM, Domingo JC, Alegre M, Fontdevila J, Martinez E, Hammond EL, Domingo P, Giral M, Villarroya F: Differential gene expression indicates that 'buffalo hump' is a distinct adipose tissue disturbance in HIV-1-associated lipodystrophy. *AIDS* 2008, 22(5):575-584.
514. Araujo-Vilar D, Lattanzi G, Gonzalez-Mendez B, Costa-Freitas AT, Prieto D, Columbaro M, Mattioli E, Victoria B, Martinez-Sanchez N, Ramazanov A *et al*: Site-dependent differences in both prelamins A and adipogenic genes in subcutaneous adipose tissue of patients with type 2 familial partial lipodystrophy. *J Med Genet* 2009, 46(1):40-48.
515. Lin FT, Lane MD: CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91(19):8757-8761.
516. Dreijerink KM, Varier RA, van Beekum O, Jeninga EH, Hoppener JW, Lips CJ, Kummer JA, Kalkhoven E, Timmers HT: The multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) tumor suppressor regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 2009, 29(18):5060-5069.
517. Molchadsky A, Shats I, Goldfinger N, Pevsner-Fischer M, Olson M, Rinon A, Tzahor E, Lozano G, Zipori D, Sarig R *et al*: p53 plays a role in mesenchymal differentiation programs, in a cell fate dependent manner. *PLoS One* 2008, 3(11):e3707.
518. Yahagi N, Shimano H, Matsuzaka T, Najima Y, Sekiya M, Nakagawa Y, Ide T, Tomita S, Okazaki H, Tamura Y *et al*: p53 Activation in adipocytes of obese mice. *J Biol Chem* 2003, 278(28):25395-25400.
519. Dorner D, Vlcek S, Foeger N, Gajewski A, Makolm C, Gotzmann J, Hutchison CJ, Foisner R: Lamina-associated polypeptide 2alpha regulates cell cycle progression and differentiation via the retinoblastoma-E2F pathway. *J Cell Biol* 2006, 173(1):83-93.
520. Gerace L, Blobel G: The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* 1980, 19(1):277-287.

521. Caron M, Auclair M, Sterlingot H, Kornprobst M, Capeau J: Some HIV protease inhibitors alter lamin A/C maturation and stability, SREBP-1 nuclear localization and adipocyte differentiation. *AIDS* 2003, 17(17):2437-2444.
522. Araujo-Vilar D, Victoria B, Gonzalez-Mendez B, Barreiro F, Fernandez-Rodriguez B, Cereijo R, Gallego-Escuredo JM, Villarroya F, Paneda-Menendez A: Histological and molecular features of lipomatous and nonlipomatous adipose tissue in familial partial lipodystrophy caused by LMNA mutations. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012, 76(6):816-824.
523. Dieudonne MN, Pecquery R, Leneuve MC, Giudicelli Y: Opposite effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes: evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *Endocrinology* 2000, 141(2):649-656.
524. Anderson LA, McTernan PG, Barnett AH, Kumar S: The effects of androgens and estrogens on preadipocyte proliferation in human adipose tissue: influence of gender and site. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86(10):5045-5051.
525. Anwar A, McTernan PG, Anderson LA, Askaa J, Moody CG, Barnett AH, Eggo MC, Kumar S: Site-specific regulation of oestrogen receptor-alpha and -beta by oestradiol in human adipose tissue. *Diabetes Obes Metab* 2001, 3(5):338-349.
526. Pedersen SB, Kristensen K, Hermann PA, Katzenellenbogen JA, Richelsen B: Estrogen controls lipolysis by up-regulating alpha2A-adrenergic receptors directly in human adipose tissue through the estrogen receptor alpha. Implications for the female fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89(4):1869-1878.
527. Mattioli E, Columbaro M, Capanni C, Maraldi NM, Cenni V, Scotlandi K, Marino MT, Merlini L, Squarzone S, Lattanzi G: Prelamin A-mediated recruitment of SUN1 to the nuclear envelope directs nuclear positioning in human muscle. *Cell Death Differ* 2011, 18(8):1305-1315.
528. Lattanzi G, Columbaro M, Mattioli E, Cenni V, Camozzi D, Wehnert M, Santi S, Riccio M, Del Coco R, Maraldi NM *et al*: Pre-Lamin A processing is linked to heterochromatin organization. *J Cell Biochem* 2007, 102(5):1149-1159.
529. Misso ML, Jang C, Adams J, Tran J, Murata Y, Bell R, Boon WC, Simpson ER, Davis SR: Differential expression of factors involved in fat metabolism with age and the menopause transition. *Maturitas* 2005, 51(3):299-306.
530. Ragnauth CD, Warren DT, Liu Y, McNair R, Tajsic T, Figg N, Shroff R, Skepper J, Shanahan CM: Prelamin A acts to accelerate smooth muscle cell senescence and is a novel biomarker of human vascular aging. *Circulation* 2010, 121(20):2200-2210.
531. Candelario J, Sudhakar S, Navarro S, Reddy S, Comai L: Perturbation of wild-type lamin A metabolism results in a progeroid phenotype. *Aging Cell* 2008, 7(3):355-367.
532. Koshimizu E, Imamura S, Qi J, Toure J, Valdez DM, Jr., Carr CE, Hanai J, Kishi S: Embryonic senescence and laminopathies in a progeroid zebrafish model. *PLoS One* 2011, 6(3):e17688.
533. Candelario J, Borrego S, Reddy S, Comai L: Accumulation of distinct prelamin A variants in human diploid fibroblasts differentially affects cell homeostasis. *Exp Cell Res* 2011, 317(3):319-329.
534. Kudlow BA, Stanfel MN, Burtner CR, Johnston ED, Kennedy BK: Suppression of proliferative defects associated with processing-defective lamin A mutants by hTERT or inactivation of p53. *Mol Biol Cell* 2008, 19(12):5238-5248.
535. Newberry EP, Xie Y, Kennedy SM, Luo J, Davidson NO: Protection against Western diet-induced obesity and hepatic steatosis in liver fatty acid-binding protein knockout mice. *Hepatology* 2006, 44(5):1191-1205.
536. Boord JB, Maeda K, Makowski L, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, Hotamisligil GS: Combined adipocyte-macrophage fatty acid-binding protein deficiency improves metabolism, atherosclerosis, and survival in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2004, 110(11):1492-1498.

# **ANEXOS**



## ANEXO I

Tabla I: Descripción de los genes estudiados, según aparece en: [www.ncbi.nlm.nih.gov/Gene/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Gene/).

Gen	Nombre oficial	Proteína ♦
<i>LMNA</i> (h)	Lamin A/C	Lamina A/C *
<i>ZMPSTE24</i> (h)	zinc metalloproteinase (STE24 homolog, <i>S. cerevisiae</i> )	FACE-1 *
<i>PPARG</i> (h)	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	PPAR $\gamma$ *
<i>DLK1</i> (Pref1) (h)	delta-like 1 homolog ( <i>Drosophila</i> )	Pref-1
<i>MYC</i> (c-myc) (h)	v-Myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	c-Myc
<i>CEBPB</i> (h)	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	C/EBP $\beta$ *
<i>SREBF1</i> (h)	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	SREBP-1c
<i>CEBPA</i> (h)	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	C/EBP $\alpha$ *
<i>FABP4</i> (h)	fatty acid binding protein 4, adipocyte	FABP4
<i>LPL</i> (h)	lipoprotein lipase	LPL
<i>LEP</i> (h)	Leptin	Leptina
<i>SLC2A4</i> (GLUT4) (h)	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	Glut4
<i>UCP1</i> (h)	uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)	UCP1
<i>CELF1</i> (h)	CUGBP, Elav-like family member 1	CELF1
<i>RB1</i> (h)	retinoblastoma 1	pRb *
<i>CCND1</i> (h)	Cyclin D1	ciclina D1
<i>CCND3</i> (h)	Cyclin D3	ciclina D3
<i>TP53</i> (h)	Tumor protein 53	p53 *
<i>CDKN1A</i> (h)	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	p21
<i>FTO</i> (h)	fat mass and obesity associated	FTO
<i>POLR2A</i> (h)	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A, 220kDa	ARN polimerasa II
<i>Lmna</i> (m)	Lamin A	Lamina A/C *
<i>Pparg</i> (m)	peroxisome proliferator activated receptor gamma	PPAR $\gamma$ *
<i>Cebpb</i> (m)	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	C/EBP $\beta$ *
<i>Cebpa</i> (m)	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	C/EBP $\alpha$ *
<i>Lpl</i> (m)	lipoprotein lipase	Lpl
<i>Lep</i> (m)	Leptin	leptina
<i>Slc2a4</i> (GLUT4) (m)	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	GLUT-4 *
<i>G6pdx</i> (m)	glucose-6-phosphate dehydrogenase X-linked	G6pdx
<i>Rn18s</i> (m)	18S ribosomal RNA	-

(h), Homo sapiens; (m), Mus musculus ; ♦, proteína/s que codifica el gen; \*, proteínas estudiadas en este trabajo

Tabla II. Descripción de los genes asociados a lipodistrofias familiares, según aparece en:  
[www.ncbi.nlm.nih.gov/Gene/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Gene/).

Símbolo oficial	Nombre oficial	Número de acceso
<i>AGPAT2</i>	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2	NM_006412.3
<i>Akt2</i>	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	NM_001626.3
<i>BANF1</i>	barrier to autointegration factor 1	NM_001143985.1
<i>BSCL2</i>	Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 (seipin)	NM_001122955.3
<i>CAV1</i>	caveolin 1, caveolae protein	NM_001753.4
<i>CIDEA</i>	cell death-inducing DFFA-like effector c	NM_022094.3
<i>LMNA</i>	lamin A/C	NM_170707.2
<i>PLIN1</i>	perilipin 1	NM_002666.4
<i>PPARG</i>	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	NM_015869.4
<i>PTRF-cavin</i>	polymerase I and transcript release factor	NM_012232.5
<i>ZMPSTE24</i>	zinc metalloproteinase (STE24 homolog, <i>S. cerevisiae</i> )	NM_005857.3

## ANEXO II

**La realización de la presente Tesis Doctoral  
ha dado lugar a las publicaciones que se presentan a continuación:**

- Araujo-Vilar D, Victoria B, Gonzalez-Mendez B, Barreiro F, Fernandez-Rodriguez B, Cereijo R, Gallego-Escuredo J, Villarroja F, Pañeda-Menendez A. Histological and molecular features of lipomatous and non lipomatous adipose tissue from subjects with familial partial lipodystrophy due to LMNA mutations. *Clinical Endocrinol* 2012 Jun;76(6):816-24 IF: 3.370
- Berta Victoria, Marta Cuervo, José Manuel Cabezas-Agrícola, Blanca González-Méndez, Giovanna Lattanzi, Rosalba Del Coco, Lourdes Loidi, Francisco Barreiro, Carlos Calvo, David Araújo-Vilar. Reduced adipogenic gene expression in fibroblasts from a patient with type 2 congenital generalized lipodystrophy. *Diabetic Medicine* 2010, 27: 1178–1187. IF: 2.871
- Araújo-Vilar D, Giovanna Lattanzi, Blanca González-Méndez, Ana Teresa Costa-Freitas, Daniel Prieto, Marta Columbaro, Elisabetta Mattioli, Berta Victoria, Noelia Martínez-Sánchez, Alia Ramazanov, Máximo Fraga, Andrés Beiras, Jerónimo Forteza, Lourdes Domínguez-Gerpe, Carlos Calvo, Joaquin Lado-Abeal. Site-dependent differences in both prelamina A and adipogenic genes in subcutaneous adipose tissue of patients with type 2 familial partial lipodystrophy. *J Medical Genetics* 2009, 46: 40-8. IF: 5.713
- Araújo-Vilar D, Joaquin Lado-Abeal, Fernando Palos-Paz, Giovanna Lattanzi, Manuel Angel Bandín, Diego Bellido, Lourdes Domínguez-Gerpe, Carlos Calvo, Oscar Pérez, Alia Ramazanov, Noelia Martínez-Sánchez, Berta Victoria, Costa Freitas AT. A new clinical condition associated with a novel mutation in LMNA gene, characterized by partial lipodystrophy, insulin-resistance, aortic stenosis and hypertrophic cardiomyopathy. *Clinical Endocrinology* 2008 Jul;69(1):61-8. IF: 3.398.